

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2000-508177
(P2000-508177A)

(43) 公表日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
			C
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 257 頁)			

(21) 出願番号 特願平9-538116
(86) (22) 出願日 平成9年4月10日(1997.4.10)
(85) 翻訳文提出日 平成10年10月9日(1998.10.9)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 0 5 9 1 1
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 0 1 8 3
(87) 国際公開日 平成9年10月30日(1997.10.30)
(31) 優先権主張番号 6 2 9 , 8 2 2
(32) 優先日 平成8年4月10日(1996.4.10)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 6 8 2 , 0 8 0
(32) 優先日 平成8年7月15日(1996.7.15)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ザ・バイオロジカル・リサーチ・センタ
ー・オブ・ザ・ハンガリアン・アカデミ
ー・オブ・サイエンス
ハンガリー国、ハー—6701・セゲド、ベ
ー・オー・ボックス・521
(71) 出願人 ローマ・リンダ・ユニバーシテイ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92350、
ローマ・リンダ (番地なし)
(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工染色体、該染色体の使用および人工染色体の製造方法

(57) 【要約】

人工染色体を有する細胞系の製造方法、人工染色体の製造方法、人工染色体の精製方法、異種DNAの人工染色体への標的挿入方法、ならびに特定の細胞および組織への染色体の導入方法が提供される。さらに、これらの方法で使用される細胞系、ならびにこれら方法によって生産される細胞系および染色体も提供される。特に、挿入異種DNAを除き、実質的に異質染色質から構成される付随人工染色体が提供される。遺伝子療法、遺伝子生産物の生産および遺伝子導入植物・動物の生産などの人工染色体の使用方法も提供される。

【特許請求の範囲】

1. 選択可能マーカーを含むDNAフラグメントを細胞に導入する段階と、
前記DNAフラグメントをゲノムDNAに取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、
サテライト人工染色体〔S A T A C〕を含む細胞を選択する段階とから成る人工染色体の製造方法。
2. 細胞の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍にDNAフラグメントを導入することを特徴とする請求項1に記載の方法。
3. 増幅可能領域がr DNAから成ることを特徴とする請求項2に記載の方法。
4. 増幅可能領域が異質染色質から成ることを特徴とする請求項2に記載の方法。
5. 細胞の染色体の挟動原体異質染色質にDNAを導入することを特徴とする請求項1または2に記載の方法。
6. 細胞が哺乳類細胞であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
7. 更に、サテライト人工染色体を単離する段階を含むことを特徴とする請求項1または2に記載の方法。
8. DNAフラグメントが、当該フラグメントを染色体の異質染色質領域にターゲットするヌクレオチドの配列を含むことを特徴とする請求項1から7のいずれか一項の方法。
9. ターゲティングヌクレオチド配列がサテライトDNAから成ることを特徴とする請求項8に記載の方法。
10. 細胞がヒト細胞であることを特徴とする請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。
11. 細胞が、魚類、昆虫類、爬虫類、両棲類、蜘蛛類または齧歯類の細胞であることを特徴とする請求項1から5及び7から9のいずれか一項に記載の方法。
12. 請求項1から11のいずれか一項に記載の方法によって製造されるサテライト人工染色体。
13. 実質的に純粋な単離されたサテライト人工染色体。

14. 約50～約450メガ塩基〔Mb〕から成るメガ染色体であることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
15. 約250～約400Mbから成ることを特徴とする請求

項13に記載のサテライト人工染色体。

16. 約150～約200Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
17. 約90～約120Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
18. 約15～約60Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
19. 請求項1から11のいずれか一項に記載の方法によって製造される人工染色体を含む細胞。
20. 請求項12から19のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体を含む細胞。
21. 哺乳類細胞であることを特徴とする請求項19または20に記載の細胞。
22. サテライト人工染色体がメガ染色体であり、方法が更に、
断片化用ベクターを導入し、これによって細胞内のメガ染色体のサイズを小さくする段階と、
約15～約60Mbのサテライト人工染色体を含む細胞を同定する段階とを含むことを特徴とする請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

23. サテライト人工染色体がメガ染色体であり、方法が、
欠矢形メガ染色体を含む細胞が産生される条件を細胞に作用させる段階を更に含むことを特徴とする請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。
24. 前記条件が、X線照射と、染色体内部の塩基対合を不安定化する物質の存在下の増殖とから選択されることを特徴とする請求項23に記載の方法。
25. 前記物質がプロモデオキシウリジンであることを特徴とする請求項24に記載の方法。

26. 更に、約15～約60Mbから成るサテライト人工染色体を含んでいる細胞を選択する段階を含むことを特徴とする請求項22から25のいずれか一項に記載の方法。

27. 請求項22から25のいずれか一項に記載の方法によって製造された人工染色体を含む細胞。

28. 人工染色体が約10～約60Mbから成るサテライト人工染色体であることを特徴とする請求項19から21及び25から27のいずれか一項に記載の細胞。

29. 約10～約60Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載の実質的に純粋な単離されたサテライト人工染色体。

30. 細胞からサテライト人工染色体を単離する段階を更に含むことを特徴とする請求項1から11及び22から26のいずれか一項に記載の方法。

31. 単離が、

中期染色体を単離し、

内因性染色体からサテライト人工染色体を識別し、

内因性染色体からサテライト人工染色体を分離することによって行われることを特徴とする請求項30に記載の方法。

32. DNA配列特異的染料で染色体を染色することによってサテライト人工染色体を内因性染色体から識別し、フローセルソーターによって分離することを特徴とする請求項31に記載の方法。

33. 選択可能マーカーを含むDNAフラグメントを細胞に導入する段階と、

前記DNAフラグメントをそのゲノムDNAに取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

増殖した細胞から新規な動原体を含む細胞を選択する段階と、から成る人工染色体の製造方法。

34. 更に、新規な動原体を含む染色体を有している細胞を単

離する段階と、ソーセージ型染色体を有している細胞が産生される条件下で細胞

を増殖させる段階とを含むことを特徴とする請求項 33 に記載の方法。

35. 更に、ソーセージ型染色体を有している細胞を単離する段階と、第一のサテライト人工染色体が製造される条件下で細胞を増殖させる段階とを含むことを特徴とする請求項 34 に記載の方法。

36. 細胞内の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍に DNA フラグメントを導入することを特徴とする請求項 35 に記載の方法。

37. 増幅可能領域が rDNA から成ることを特徴とする請求項 36 に記載の方法。

38. 増幅可能領域が異質染色質から成ることを特徴とする請求項 36 に記載の方法。

39. DNA を細胞の染色体の挟動原体異質染色質に導入することを特徴とする請求項 35 または 36 に記載の方法。

40. 更に、

第一サテライト人工染色体にターゲットされる断片化用ベクターを導入する段階と、細胞を増殖させる段階と、第一サテラ

イト人工染色体よりも小さい第二サテライト人工染色体を含む細胞を選択する段階とを含むことを特徴とする請求項 33 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

41. 選択された細胞が、新規な動原体を含む二動原体型染色体を有していることを特徴とする請求項 40 に記載の方法。

42. 選択された細胞が、元二動原体型染色体と、新規な動原体を含むミニ染色体とを有していることを特徴とする請求項 40 に記載の方法。

43. 選択された細胞が、元二動原体型染色体を有していることを特徴とする請求項 40 に記載の方法。

44. 選択可能マーカーを含む DNA フラグメントを細胞に導入する段階と、

前記 DNA フラグメントをそのゲノム DNA に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

増殖した細胞から二動原体型染色体を産生した細胞を選択する段階と、

異質染色質アームをもつ染色体を含んでいる細胞が産生されるような選択条件

下で細胞を増殖させる段階とから成る人工染色体の製造方法。

45. 更に、異質染色質アームをもつ染色体を含んでいる細胞を選択する段階と、染色体を不安定化する物質の存在下で前記細胞を増殖させる段階とを含むことを特徴とする請求項44に記載の方法。

46. 更に、約50～約400Mbの異質染色質性の染色体を有している細胞を同定する段階を含むことを特徴とする請求項45に記載の方法。

47. 細胞内の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍にDNAフラグメントを導入することを特徴とする請求項44から46のいずれか一項に記載の方法。

48. 増幅可能領域がrDNAから成ることを特徴とする請求項47に記載の方法。

49. 増幅可能領域が異質染色質から成ることを特徴とする請求項47に記載の方法。

50. DNAを細胞の染色体の挟動原体異質染色質に導入することを特徴とする請求項47に記載の方法。

51. サテライト人工染色体を胚細胞に導入する段階から成る（ヒト以外の）トランスジェニック動物の産生方法。

52. 胚細胞が幹細胞であることを特徴とする請求項51に記

載の方法。

53. 胚細胞が胚に存在することを特徴とする請求項51に記載の方法。

54. サテライト人工染色体が遺伝子産物をコートするヘテロログスDNAであることを特徴とする請求項51から53のいずれか一項に記載の方法。

55. サテライト人工染色体が治療用物質をコードするヘテロログスDNAを含むことを特徴とする請求項51から54のいずれか一項に記載の方法。

56. 抗HIVリボザイムが抗gagリボザイムであり、腫瘍抑制遺伝子がp53であることを特徴とする請求項55に記載の方法。

57. 産生物が、発現によって（ヒト以外の）トランスジェニック動物中の病原

体に対する免疫防御応答を誘発する抗原を含むことを特徴とする請求項 5 4 に記載の方法。

5 8. 産生物が、発現によって複数の病原体に対する免疫防御応答を誘発する複数の抗原を含むことを特徴とする請求項 5 4 に記載の方法。

5 9. (ヒト以外の) トランスジェニック動物が魚類、昆虫類、

爬虫類、両棲類、蜘蛛類または哺乳類であることを特徴とする請求項 5 1 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

6 0. サテライト人工染色体が、細胞融合、キャリア系による脂質仲介トランスフェクション、マイクロインジェクション、マイクロセル融合、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクトル、核移入、衝撃または直接 DNA 移入によって導入されることを特徴とする請求項 5 1 から 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

6 1. 請求項 5 1 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法によって産生される (ヒト以外の) トランスジェニック動物。

6 2. 魚類、昆虫類、爬虫類、両棲類、蜘蛛類または哺乳類であることを特徴とするトランスジェニック動物。

6 3. 選択可能マーカーを含む DNA フラグメントを細胞に導入する段階と、前記 DNA フラグメントをそのゲノム DNA に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

選択可能マーカーと真正染色質とを含む約 1 0 M b ～約 5 0 M b のミニ染色体を有している細胞を選択する段階と、

ミニ染色体を単離して植物または動物の細胞に導入する段階

とから成るトランスジェニック植物または動物の産生方法。

6 4. 細胞の選択後に、1 つまたは複数の遺伝子産物をコードする DNA を細胞に導入し、(1 つまたは複数の) 遺伝子産物をコードする DNA を含むミニ染色体を有している細胞が産生される選択条件下で細胞を増殖させることを特徴とする請求項 6 3 に記載の方法。

65. 細胞の選択後に、1つまたは複数の遺伝子産物をコードするDNAを細胞に導入し、(1つまたは複数の)遺伝子産物をコードするDNAを含むサテライト人工染色体を有している細胞が産生される選択条件下で細胞を増殖させることを特徴とする請求項64に記載の方法。

66. 動物または植物の動原体のクローニング方法であって、

植物または動物のゲノムを含むDNAフラグメントのライブラリーを調製する段階と、

選択された植物または動物の異なる種に由来の動原体と選択可能マーカールとを各々が含む哺乳類サテライト人工染色体に前記フラグメントの各々を導入する段階と、

前記サテライト人工染色体の各々を細胞内に導入して選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

サテライト人工染色体を有している細胞を同定する段階と、

これらの細胞から出発サテライト人工染色体の動原体とは異なる動原体を含むサテライト人工染色体を有している細胞を選択する段階とから成る方法。

67. それぞれ受託番号96040926、96040927、96040929及び96040928でE C A C Cに寄託されたT F 1 0 0 4 G 1 9 C 5、1 9 C 5 x H a 4、H 1 D 3及びG 3 D 5のいずれかの同定形質を有する細胞系。

68. 約50～400Mbから成るメガ染色体を含む細胞系。

69. メガ染色体が250～約400Mbから成ることを特徴とする請求項68に記載の細胞系。

70. メガ染色体が約150～約200Mbから成ることを特徴とする請求項68に記載の細胞系。

71. メガ染色体が約90～約120Mbから成ることを特徴とする請求項68に記載の細胞系。

72. メガ染色体が約60～約100Mbから成ることを特徴とする請求項68に記載の細胞系。

73. 治療用物質のDNAを含むサテライト人工染色体をターゲット細胞に導入

する段階と、

得られたターゲット細胞を宿主動物に導入する段階とから成る遺伝子治療方法

。

74. ターゲット細胞が、リンパ球、幹細胞、神経細胞、昆虫細胞、ニワトリ細胞または筋肉細胞であることを特徴とする請求項73に記載の方法。

75. ミニクロモソームがEC3/7C5細胞系に存在するミニ染色体であることを特徴とする請求項73に記載の方法。

76. 染色体がKE12/4細胞系に存在するλneo染色体であることを特徴とする請求項73に記載の方法。

77. 約20Mb～約200Mbであることを特徴とする請求項76に記載の人工染色体。

78. 約100Mb～約200Mbであることを特徴とする請求項76に記載の人工染色体。

79. 約20Mb～約200Mbであることを特徴とする請求項76に記載の人工染色体。

80. 約1Mb～約15Mbであることを特徴とする請求項76に記載の人工染色体。

81. 動物が哺乳動物または卵生動物であり、サテライト人工染色体がタンパク質と、動物の母乳または動物の卵の内部で遺

伝子を発現させる調節要素を含むことを特徴とする請求項51に記載の方法。

82. 動物が、雌ウシ、ヤギ、雄ウシ、ブタ及びヒツジから選択されることを特徴とする請求項81に記載の方法。

83. 動物が家禽から選択されることを特徴とする請求項81に記載の方法。

84. サテライト人工染色体がヒト細胞表面タンパク質発現用遺伝子をコードするDNAを含み、それにより動物の器官がヒトタンパク質を発現し、ヒトに移植されたときに拒絶が生じないことを特徴とする請求項51に記載の方法。

85. 配列13、14または15で示される配列を有するDNAから成る単離D

NA。

86. 配列13、14または15で示される配列を有するDNAから成る単離DNA。

87. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有する単離DNAフラグメント。

88. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項14に記載のサテライト人工染色体。

89. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。

90. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。

91. ヘテロログス遺伝子の多数コピーまたは複数のヘテロログス遺伝子から成る人工染色体〔AC〕を含んでいる細胞から成る細胞性産生系。

92. 人工染色体がサテライト人工染色体であることを特徴とする請求項91に記載の細胞性産生系。

93. ヘテロログス遺伝子が代謝経路を構成するタンパク質をコードすることを特徴とする請求項91または92に記載の系。

94. 代謝経路の発現によって産生される物質の発現方法であって、代謝経路を構成するタンパク質が発現されて前記物質を産生する条件下で請求項93に記載の系を培養する段階から成る方法。

95. 産生物がビタミン、ホルモン、ヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質またはペプチドであることを特徴とする請求項94

に記載の方法。

96. 動物が卵生であることを特徴とする請求項51に記載の方法。

97. 動物がニワトリであることを特徴とする請求項51に記載の方法。

98. 動物が昆虫であることを特徴とする請求項51に記載の方法。

99. 請求項13から18または88から90のいずれか一項に記載のサテライ

ト人工染色体を植物細胞に導入する段階と、植物が発生する条件下で細胞を培養する段階とから成るトランスジェニック植物の産生方法。

100. プロトプラスト融合、マイクロインジェクション、マイクロセル融合、脂質仲介遺伝子導入、エレクトロポレーション、微粒子衝撃、または、直接DNA導入によってサテライト人工染色体を導入することを特徴とする請求項99に記載の方法。

101. 請求項13から18または88から90のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体を細胞に導入する段階と、（1つまたは複数の）遺伝子産物が発現される条件下で細胞を培養

する段階とから成る、（1つまたは複数の）遺伝子産物の産生方法。

102. 代謝経路を構成するタンパク質をコードする一連の遺伝子の発現によって遺伝子産物が産生されること、及び、サテライト人工染色体がこれらの遺伝子の各々を含むことを特徴とする請求項102に記載の方法。

103. 動原体とテロメアとメガレプリケーターと選択可能マーカーとから成り、動原体が請求項12から18及び88から90のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体に由来することを特徴とする *in vitro* 合成された哺乳類人工染色体〔ISMAC〕。

104. 動原体とテロメアとメガレプリケーターと選択可能マーカーとから成り、動原体が請求項12から18及び88から90のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体に由来することを特徴とする *in vitro* 合成された哺乳類人工染色体〔ISMAC〕。

105. 更に、異質染色質を含むことを特徴とする請求項103または104に記載のISMAC。

106. メガレプリケーターがrDNAから成ることを特徴と

する請求項103から105のいずれか一項に記載のISMAC。

107. 動原体がヒト動原体であることを特徴とする請求項103から106のいずれか一項に記載のISMAC。

108. 動原体がメガ染色体に由来することを特徴とする請求項103から107のいずれか一項に記載のISMAC。

109. 動原体がヨーロッパアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー・(ECACC)に受託番号96040929で寄託された細胞系の同定形質の全部を有する細胞系に由来することを特徴とする請求項103、105、106または108に記載のISMAC。

110. 産生物がホルモン、抗体、サイトカイン、成長因子、調節タンパク質、分泌タンパク質であることを特徴とする請求項54に記載の方法。

111. 産生物が嚢胞性線維症トランスメンブラン調節タンパク質(CFTR)、抗HIVリボザイムまたは腫瘍抑制遺伝子であることを特徴とする請求項54に記載の方法。

112. 動物がヒトであることを特徴とする請求項66に記載の方法。

113. 動原体とテロメアとメガレプリケーターと複製可能な

ISMACと產生する選択可能マーカーとを組合せる段階から成り、動原体が請求項12から18及び88から90のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体に由来することを特徴とする *in vitro* 合成された哺乳類人工染色体〔ISMAC〕の製造方法。

114. 更に、ISMAC中にrDNAを含むことを特徴とする請求項113に記載の方法。

115. テロメアが配列29の複数の反復を含むことを特徴とする請求項113に記載の方法。

116. テロメアが約1kB～約1Mbであり、好ましくは約1kB～約500kBであることを特徴とする請求項115に記載の方法。

117. テロメアが配列29の複数の反復を含むことを特徴とする請求項103から108のいずれか一項に記載のISMAC。

118. テロメアが約1kB～約1Mbであり、好ましくは約1kB～約500kBであることを特徴とする請求項117に記載のISMAC。

119. 選択可能マーカーを含むDNAフラグメントを細胞に導入する段階と、

前記DNAフラグメントをそのゲノムDNAに取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階とから成り、

DNAフラグメントが細胞内の染色体の増幅可能領域の内部または近傍に導入され、増幅可能領域に由来のDNAを含むミニ染色体が産生され、ミニ染色体が異質染色質よりも多い真正染色質を含む人工染色体であることを特徴とする人工染色体の製造方法。

120. 増幅可能領域がrDNAであることを特徴とする請求項119に記載の方法。

121. 更に、ミニ染色体を単離する段階を含むことを特徴とする請求項119または120に記載の方法。

122. 請求項119から121のいずれか一項に記載の方法によって産生されるミニ染色体。

123. 更に、遺伝子産物をコードするDNAを導入する段階を含み、遺伝子をコードするDNAが、選択可能マーカーを含むフラグメントに存在するかまたは第二のDNAフラグメントに存在すること、及び、得られたサテライト人工染色体が遺伝子産物をコードするヘテロログスDNAを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

人工染色体、該染色体の使用および人工染色体の製造方法

関連出願

米国の国内段階に関して本出願は、発明の名称「ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES」で1996年8月7日出願された同時係属中の米国特許出願08/695191号（GYULAH ADLACZKYおよびALADAR SZALAY）の一部継続出願である。本出願はさらに、発明の名称「ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES」で1996年7月15日出願された同時係属中の米国特許出願08/682080号（GYULA HADLACZKYおよびALADAR SZALAY）の一部継続出願でもあり、発明の名称「ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES」で1996年4月10日出願された同時係属中の米国特許出願08/629822号（GYULA HADLACZKYおよびALADAR SZALAY）の一部継続出願でもある。

国際段階に関しては、これら各出願に対する優先権の恩恵が

請求されており、その出願の主題はその全体が、本明細書に組み込まれるものとする。

米国特許出願08/695191号は、米国特許出願08/682080号の一部継続出願であり、米国特許出願08/629822号の一部継続出願でもある。米国特許出願08/682080号は、米国特許出願08/629822号の一部継続出願である。

本出願は、現在米国特許5288625号である米国特許出願07/759558号に関係し、1996年10月21日出願の米国特許出願08/734344号に関係し、1995年1月19日出願の認可された米国特許出願08/375271号に関係するものであり、該米国特許出願08/375271号は1993年6月23日出願の米国特許出願08/080097号の継続出願であり、該出願は1992年6月3日出願の米国特許出願07/892487号の継続出願であり、該出願は1990年5月9日出願の米国特許出願07/521073

号の継続出願である。

許容される範囲まで、米国特許出願 08/734344 号、08/695191 号、08/682080 号、08/629

822 号、08/375271 号、08/080097 号、07/892487 号および 07/521073 号ならびに米国特許 5288625 号のそれぞれの主題は、それに対する引用によって、全体が本明細書に組み込まれるものとする。

発明の属する技術分野

本発明は、人工染色体を含む細胞系の製造方法、人工染色体の単離方法、異種 DNA の該染色体への標的挿入、特定の細胞および組織への該染色体の導入、ならびに該染色体の単離および大量生産方法に関するものである。さらには、上記方法で使用する細胞系、該方法によって製造される細胞系および染色体も提供される。さらには、人工染色体を使用した、異種蛋白の細胞に基づく製造方法、遺伝子治療および遺伝子導入動物、特に人間以外の遺伝子導入動物の形成方法も提供される。

発明の背景

遺伝子治療および異種核酸の組換え体発現のためのいくつかのウィルスベクター、非ウィルス性導入系および物理的導入系が開発されている（例えば、Mitani et al. (1993) Trends Biotech. 11:162-166 参照）。しかしながら現在使用できる系には、特に持続的、安定または制御された遺伝子発現が必要な場合に多

くの制限がある。その制限には、（１）ウィルスベクターが許容できる DNA 挿入物〔遺伝子〕の大きさに、多くて約 10 キロ塩基〔k B〕程度の制限があるための大きさ上の制限（それに対して、治療上重要と考えられる多くの哺乳動物遺伝子は、特に全ての制御要素が含まれる場合、その限界よりかなり高い）、（２）組み込みの標的を特異的に定めることができないため、ランダムな組み込みが起こって、重要な遺伝子または癌抑制遺伝子を破壊する危険性があること、（３）ランダムに組み込まれた治療遺伝子の発現が、核における機能的区画化によっ

で影響を受けると考えられ、しかも染色質に基づく位置効果によって影響を受けること、(4) コピー数と従ってゲノムに組み込まれる所定の遺伝子の発現を制御できないことなどがある。従って、遺伝子導入における改善と安定な発現系が望まれている(例えば、Mulligan(1993) *Science* 260:926-932参照)。

さらに、安全かつ有効なベクターおよび遺伝子治療には、現在使用可能な系では保証されない多くの特徴がなければならない。例えば、安全なベクターは、宿主の遺伝物質において組換えもしくは突然変異によって望ましくない変化を促進し得るDNA要素を含んでいてはならず；ベクターを有する細胞、組織

もしくは生物において有害効果を起こす可能性のあるものであってはならず；しかもゲノムの機能を妨害するものであってはならない。さらに、ベクターが非組み込み型であるか、あるいは部位特異的組み込み用であることが有利であると考えられる。さらに、ベクターが有する治療遺伝子のコピー数を制御して安定なものとする必要があり；ベクターは導入される遺伝子の独立かつ制御された機能を確保すべきであり；ベクターは大きい(Mbまで)挿入物を受け入れ、その挿入物の機能的安定性を確保するものでなければならない。

しかしながら、既存の遺伝子導入技術の限界があるために、大きい(Mb以上の大きさ)遺伝子および遺伝子複合体を、治療遺伝物質の安全で、制御された、持続的な発現を提供する調節要素とともに転移させるのに好適な別のベクター系の開発が望まれる。

現在、利用可能なベクターでこれらの要件を全て満たすものはない。しかしながら、これらの特徴のほとんどを染色体が有している。そこで人工染色体は、遺伝子治療だけでなく、多くの遺伝子発現の調整を必要とするかまたは大きい遺伝子によってコードされる遺伝子産生物の安定で高レベルな制御された生

産および他の用途に理想的なベクターであると考えられる。酵母での異種遺伝子の発現のための人工染色体が利用可能であるが、所定の哺乳動物の人工染色体の構築は達成されていない。単離された機能的哺乳動物動原体がなく、その産生および安定複製のための必須条件の解明が不十分であることが、そのような構築

の障害となっている。酵母の場合とは異なり、哺乳動物の動原体に非常に近い選択可能な遺伝子はなく、非常に反復性の高い挟動原体異質染色質DNAが長く続くことで、染色体歩行などの現在利用できる方法を用いた哺乳動物動原体の単離が実質的に不可能となる。哺乳動物の人工染色体生産には他の戦略が必要であり、いくつか開発されている。例えば、米国特許5288625号には、人工染色体、すなわち約20～30メガ塩基であるミニ染色体を含む細胞系が提供されている。しかしながら、その染色体の単離に用いられている方法では、わずか約10～20%の純度のものしか得られない。そこで、別の人工染色体の開発および単離・精製方法の完成、ならびにより多用途な染色体の開発およびミニ染色体のさらなる特性決定が、この技術の可能性を実現する上で必要である。

従って本発明の目的は、哺乳動物の人工染色体ならびに外来

DNAをそのような染色体に導入する方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、当該染色体の単離・精製方法を提供することにある。本発明の目的はさらに、特定の細胞に哺乳動物の人工染色体を導入する方法を提供すること、ならびにそうして得られる細胞と、人工染色体を含む遺伝子導入の人間以外の動物、鳥、魚および植物を提供することにある。本発明の目的はさらに、人工染色体を用いる遺伝子療法および遺伝子産物の発現方法を提供することにある。本発明の目的はさらに、生物特異的な人工染色体を新規に（デノボ）構築する方法を提供することにある。本発明のさらに別の目的は、デノボ哺乳動物人工染色体を形成する方法を提供することにある。

発明の概要

哺乳動物人工染色体〔MAC〕が提供される。MACおよび本発明の方法を用いて製造される昆虫、鳥、ニワトリおよび魚などの他の高等真核生物についての人工染色体も提供される。そのような染色体の形成方法および単離方法も提供される。昆虫、鳥、ニワトリおよび魚類などの他の動物から、MACを用いて人工染色体を構築する方法も提供される。人工染色体は、十分機能的に安定な染色体である。2種類の人工染色体が提供

される。1 種類は、本明細書において S A T A C と称するもので（付随人工染色体または付随 D N A に基づく人工染色体（これら用語は本明細書では互換的に使用する））、安定な異質染色質染色体であり、他方の種類は真正染色質の増幅に基づくミニ染色体である。

人工染色体は、1 個のプロモーターに機能的に連結された 1 個の遺伝子の複数コピーあるいは各個別のプロモーターに連結された各コピーまたはいくつかのコピーなどの 1 個もしくは複数の遺伝子を含むメガ塩基 [M b] 対の大きさの D N A 断片の標的組み込みのためのゲノム外座を提供するものである。そこで、M A C を用いて、細胞、組織および動物ならびに鳥、ニワトリ、魚および植物などの生物に遺伝子を導入する方法も提供される。組み込み異種 D N A を有する人工染色体は、遺伝子治療；遺伝子産生物、特に複遺伝子性生成経路の発現を必要とし、遺伝子導入（人間以外の）動物、鳥、鶏および魚を生産するための、胚幹細胞 [E S 細胞] などの生殖細胞系細胞の核への導入のための産生物の製造方法で使うことができる。単子葉植物および双子葉植物などの遺伝子導入植物も、本発明では想到される。

哺乳動物人工染色体は、対象とする蛋白をコードする遺伝子の導入のためのゲノム外特異的組み込み部位を提供し、メガ塩基の大きさの D N A 組み込みが可能であることから、例えば、代謝経路全体をコードする遺伝子あるいは嚢胞性繊維症 [C F ; 約 2 5 0 k b] ゲノム D N A 遺伝子、多価ワクチン製造のための一連の抗原をコードする多重遺伝子などのいくつかの遺伝子などの非常に大きい遺伝子を安定に細胞に導入することができる。p 5 3 などの腫瘍抑制遺伝子、嚢胞性繊維症膜貫通調節蛋白質 [C F T R] の c D N A、および抗 H I V g a g リボザイム (ribozyme) 遺伝子などの抗 H I V リボザイムの遺伝子等のそのような遺伝子を人工染色体に標的導入するためのベクターも提供される。

本発明で提供される染色体は、細胞、好ましくは安定な細胞系に、1 個または複数の選択可能なマーカーをコードする D N A を含む異種 D N A を導入し；細胞を選択条件で成長させ；得られたクローンの中から、1 以上の動原体および／またはその断片を有する染色体を含むクローンを確認することで形成される。追

加の動原体を製造する増幅が、染色体の挟動原体領域の動原体付近で異種DNAが組み込まれた染色体を含む細胞で

起こる。次に、特定のクローン細胞を用いて、人工染色体を形成する。

DNAの非標的導入によって適切な座への組み込みをいくつかの頻度で生じるが、標的導入が好ましい。そこで好ましい実施態様では、細胞に導入されて人工染色体の形成を行う選択可能マーカを有するDNAが、挟動原体領域、異質染色質および特に染色体のrDNAなどの増幅可能領域を標的としてそれを導入する配列を有する。例えば、それぞれマウス付随DNAおよびヒト付随DNAに特異的なそのようなDNAを含むpTEMPUDおよびpHASPUUD（本発明で提供）のようなベクターが提供される。プラスミドpHASPUUDは、ヒト染色体を特異的に標的とするヒト付随DNA配列を含むpTEMPUDの誘導体である。好ましい標的配列には、異種DNAを標的として、rDNAを含む染色体のrDNA領域に組み込む哺乳動物リボソームRNA（rRNA）遺伝子配列（本明細書においてはrDNAと称する）などがある。例えば、マウスrDNAを含むpTERPUUDなどのベクターが提供される。細胞に存在する染色体に組み込む際、これらのベクターは増幅を誘発することができ、それによって追加の動原体が形成される。

人工染色体は、細胞を多動原体染色体、代表的には二動原体染色体とともに、染色体が切断されてミニ染色体と元二動原体（formerly dicentric）染色体とを形成する条件下に培養することで形成される。本発明で提供されるMACの中には、主として短い付随DNAの反復単位からなり、ほぼ完全に異質染色性であることから、異種もしくは異質のDNAの挿入がなければ、染色体が好ましくは遺伝情報を持たないか、あるいはrDNA配列などの非蛋白コード遺伝子配列のみを有するSATACがある。そこで、それは有害である可能性のある遺伝子を持たないことから、哺乳動物宿主へのDNA組み込みのための「安全な」ベクターとして使用することができる。SATACは、例えば米国特許528625号におけるようなミニ染色体断片からではなく、元二動原体染色体の断片から形成

される。

さらに、真正染色質ミニ染色体の形成方法およびその使用方法も本発明で提供される。ある種のMAC、すなわち米国特許5288625号にすでに記載されているミニ染色体の形成方法ならびに異種DNAの発現のためのその使用方法が提供される。ミニ染色体などのMACを形成するための本発明で提供される特定の方法では、哺乳動物rDNAを含む異種DNA

および1以上の選択可能マーカー遺伝子を細胞に導入し、それを次に、選択条件下に成長させる。複数の動原体を有する染色体を含む得られた細胞を選別し、染色体が分裂してミニ染色体およびミニ染色体が放出される元動原体（代表的には二動原体）染色体を形成する条件下で培養する。

ミニ染色体を含む細胞系およびその細胞融合への使用も提供される。1実施態様において、哺乳動物ミニ染色体を含む細胞系を、特定の遺伝子または複数遺伝子をコードするドナーDNAに対する受容細胞として使用する。ドナーDNAのミニ染色体への組み込みを容易にするため、受容細胞系には好ましくはミニ染色体を含ませるが、やはり元二動原体染色体は含ませない。これは、細胞融合ならびにミニ染色体を含むが元二動原体染色体を含まない細胞の選別などの本明細書に開示の方法によって行うことができる。ドナーDNAを、第2の選択可能マーカーに連結し、ミニ染色体を標的とし、それに組み込む。得られた染色体を、細胞融合によって、チャイニーズ・ハムスター細胞系[CHO]などの適切な受容細胞系に転移させる。遺伝子操作染色体を有する細胞の大量生産後、その染色体を単離する。詳細には、コルヒチン添加などによって中期染色体を得

て、それを細胞溶解物から精製する。その染色体を、異種DNAのクローニング、配列決定および細胞への組み込みに使用する。

選択条件下での反復培養ならびに元二動原体染色体から生産される染色体を含む細胞のサブクローニングによって形成される各種大きさのSATACも提供される。SATACの例としては、約15Mb〔2個の約7.5Mbブロック〕である反復DNA単位に基づいたものである。他の生物および他の染色体から形成

されるS A T A Cの反復DNA単位は変動し得るが、代表的には、約7～約20 Mb程度であると考えられる。反復DNA単位は本明細書ではメガレプリコンと称するが、それは例示のS A T A Cでは、異種DNAおよび非付随DNAなどの非DNAが隣接する付随DNAの縦列ブロックを含む。増幅によって、異種「外来」DNAと接する2個の反転メガレプリコンを含む1列の染色体部分（それぞれアンプリコンと称される）が生産される。細胞融合、選択培地での成長および／またはB r d U [5-ブロモデオキシウリジン] 処理または他のゲノム不安定化試薬または不安定化剤による他の処理（X線などによるイオン化放射線照射等）ならびにサブクローニングを

繰り返すことで、150～200 Mbの「ソーセージ」染色体、500～1000 Mbのギガ染色体、安定な250～400 Mbのメガ染色体ならびにそれらから誘導される各種の相対的に小さい安定な染色体などの安定な異質染色性または部分的に異質染色性の染色体を有する細胞系が得られる。これらの染色体は、これらの反復単位に基づいたものであり、発現される異種DNAを含み得るものである。

そこで、両方の種類のMAC（すなわち、S A T A C Sおよびミニ染色体）の製造方法が提供される。その方法は、哺乳動物、鳥、鶏、魚、昆虫および植物などの高等真核生物細胞由来の動原体を有する人工染色体の製造に利用される。

得られる染色体を本発明で提供される方法によって精製して、異種DNAを特定細胞に導入して異種DNAによってコードされた遺伝子産物の生産、遺伝子導入（人間以外）の動物、鳥、鶏、魚および植物の生産あるいは遺伝子治療を行うためのベクターを提供することができる。

さらに、ミニ染色体およびS A T A Cの断片化のための方法およびベクターが提供される。そのような方法およびベクターは、比較的小さく安定な人工染色体のin vivoでの形成に使用

することができる。染色体断片化のためのベクターを用いて、メガレプリコン、動原体および2個の末端小粒を有し、約7.5 Mb～約60 Mb、好ましくは約

10Mb～15Mbおよび30～50Mbのものである人工染色体を製造する。例を挙げると、好ましい範囲は約7.5Mb～50Mbである。そのような人工染色体は、他の方法によって製造することもできる。

15Mb（または2個の反転繰り返し単位を有する30Mbアンプリコン）または30Mb以上のそのマルチマー（例：60Mb）の単離は、in vitroで操作できる安定な染色体ベクターを提供するものでなければならない。MACを小さくしてより安定な自己再生人工染色体を形成する方法も提供される。

さらに本発明では、本明細書で提供のもののような哺乳動物人工染色体をin vitroで製造する方法ならびに得られる染色体も提供される。その方法では、構造要素および機能要素をin vitroで組み立てて、安定な人工染色体を提供する。そのような要素には、動原体、2個の末端小粒、1個以上の複製源ならびに付随DNAなどの充填物異質染色質などがある。その後の選択のための選択可能マーカ―などもあり得る。これらの特異的DNA要素は、異種DNAの細胞への導入ならびに人工染色

体、特にSATACを生じるその後の増幅によって形成されたものなどの本発明で提供される人工染色体から得ることができる。人工染色体のin vitroでの構築に使用する動原体配列も、本発明で提供される動原体クローニング法を用いることで得ることができる。好ましい実施態様においては、複製源、特にメガレプリケートを提供する配列はrDNA由来のものである。これらの配列には好ましくは、rDNA複製源および増幅促進配列などがある。

異種DNAを人工染色体に狙って組み込む方法およびベクターも、相対的に小さいが安定で自己再生性の人工染色体を製造するための染色体の断片化方法およびそのためのベクターと同様に提供される。

前記染色体を細胞に導入して、細胞源に応じて、安定な形質転換細胞系または細胞を得る。導入は、エレクトロポレーション；リン酸カルシウム沈殿などによる直接取り込み；リポフェクション（lipofection）、微小核体融合、脂質介在キャリア系その他の好適な方法による単離染色体の取り込みなど（ただし、これらの方法に限定されるものではない）の好適な方法によって行われる。得られる

細胞は、細胞中での蛋白生産に使用する

ことができる。その染色体は単離して、遺伝子取り込みに使用することができる。基準染色体と比較してMACにおいて異なる染色体のDNA含有量に基づく染色体の単離方法が提供される。さらに、MACの含有量、特に密度および大きさによって決まる方法も提供される。

これらの人工染色体は、遺伝子治療；遺伝子産生物生産系；人化した遺伝子形質転換動物臓器の生産；遺伝子導入した植物および哺乳動物、鳥、鶏、魚、無脊椎動物、脊椎動物、は虫類および昆虫などの動物（人間以外）、臓器または情報保存媒体として染色体要素を使用すると考えられる機器の生産；ならびに、動原体機能の分析および研究；in vitroで構築できる人工染色体ベクターの生産；および生物特異的人工染色体の製造で使用する事ができる。人工染色体は、微量注入法、細胞融合、微小核体融合、エレクトロポレーション、核転移、電気融合、粒子衝撃法（projectile bombardment）、核転移、リン酸カルシウム沈殿、脂質介在転移系および他のそのような方法を用いて、細胞に導入することができる。人工染色体とともに使用するのに特に好適な細胞には、特にトマト、シロイヌナズナ（arabidopsis）およびその他のような植物細胞；カイコ細胞な

どの昆虫細胞；昆虫の幼虫；魚；は虫類；両生類；蜘蛛；哺乳動物細胞；鳥の細胞；胚幹細胞；造血幹細胞；胚ならびに養子免疫療法で使用するリンパ球および神経もしくは神経細胞などの遺伝子療法で使用する細胞などがあるが、これらに限定されるものではない。そこで、遺伝子産生物および遺伝子導入（人間以外）動物および植物を生産する方法も提供される。得られる遺伝子導入動物・植物も提供される。

これらの染色体を含む細胞系の例も提供される。

特定生物についての人工染色体を製造する方法および動原体のクローニング方法も提供される。例えば、異なる生物で使われる人工染色体を形成するために提供される2つの方法の例を以下に示す。第1に、本発明の方法を異なる生物に適用することができる。第2に、生物特異的人工染色体の形成手段および動原体

をクローニングする手段が提供される。詳細には、動物または植物からの動原体をクローニングする方法は、その植物もしくは動物のゲノムを含むDNA断片のライブラリを得て、各断片を、選択した植物もしくは動物（通常は非哺乳動物）と異なる生物（通常は哺乳動物）からの動原体および選択可能なマーカーを含む哺乳動物付随人工染色体〔SATAC〕に導入

することで得られる。選択される植物または動物は、哺乳動物動原体が機能しないものである。各SATACを、選択条件下で成長する細胞に導入し、それを選択条件下に成長させ、SATACを有する細胞を確認する。そのようなSATACはライブラリからのDNAによってコードされた動原体を有するはずであるか、あるいは選択された生物における安定な複製に必要な要素を有するはずである。

比較的大きいDNA断片が人工染色体に含まれているライブラリも提供される。

遺伝子導入（人間以外）動物、無脊椎動物および脊椎動物、植物および昆虫、魚、は虫類、両生類、蜘蛛、鳥、鶏および哺乳動物も提供される。特に興味深いものは、耐性を与えるか疾患に対する感受性を低下させる遺伝子を発現する遺伝子導入（人間以外）動物および植物である。例えば転移遺伝子（transgene）は、ウイルス、細菌または害虫などの病原体に対して毒性があるが、遺伝子導入宿主には毒性を持たない蛋白をコードすることができる。さらに、複数の遺伝子をMACに導入できることから、抗原をコードする一連の遺伝子を導入し、それが発現時に、抗原への曝露によって免疫または何らかの保

護を与える疾患に対して宿主動物を免疫感作する〔多価ワクチンと同様にして〕上で役立つ。

さらには、疾患の研究ならびにその治療および治療法を開発する上で使用されるある種の疾患および障害のモデルとして役立つ遺伝子導入（人間以外）動物も興味深い。そのような疾患の動物モデルは、MACで動物に導入され、その動物において疾患もしくは障害を誘発する遺伝子〔代表的には、疾患関連の突然変

異を有する遺伝子]を発現する。同様に、アンチセンスRNAをコードする遺伝子を有するMACを動物細胞に導入して、条件的「ノックアウト」遺伝子導入（人間以外）動物を得ることができる。そのような動物では、アンチセンスRNAの発現によって、アンチセンスRNAに相当する遺伝子の産生物が減少するか完全になくなる。さらに興味深いものとしては、動物の母乳で発現される治療蛋白をコードする含MAC遺伝子を有している遺伝子導入哺乳動物がある。動物の臓器を人化するのに役立つ含MAC遺伝子が発現する、異物移植術用の遺伝子導入（人間以外）動物も興味深い。動物臓器の人化で使用可能と考えられる遺伝子には、ヒト表面抗原をコードするものなどがある。

哺乳動物動原体などの動原体のクローニング方法も提供される。詳細には、1実施態様において、SATACの断片から構成されるライブラリを、チロシナーゼをコードするDNAなどの検出可能なマーカーを有するYAC〔酵母人工染色体〕にクローニングし、次にアルビノマウス胎仔などの哺乳動物細胞に導入する。哺乳動物で機能する動原体を含むようなYACを有する胎仔から得られるマウスは、前記の検出可能マーカーを発現する。そこで、機能性の哺乳動物動原体が導入されたアルビノマウス胎仔からマウスを得た場合、そのマウスは有色であるか、または有色領域を有する。

DNAの反復縦列配置を製造する方法も提供される。本明細書ではテロメアDNAを用いた例を示しているこの方法は、いかなる反復配列にも適用可能であり、特に複雑さの小さい反復に適用可能である。縦列DNAの配置の合成のために本発明で提供される方法は、一連の延長段階に基づくものであり、その延長段階では、反復配列を連続的に倍化することで、縦列反復の配置が級数的に延長する。縦列反復を有するDNA断片を合成する方法の1実施態様について、以下に説明する。出発原料としては、2個のオリゴヌクレオチドを用いる。オリゴヌクレ

オチド1は、長さkの反復配列（その横は無関係である）のものであり、反復配列の比較的短い長さのもの（60～90ヌクレオチド）を有し、それに隣接して適切に選択された制限部位がある。

[illegible]

ここでS1はE1によって開裂する制限部位1であり、S2はE2によって開裂する第2の制限部位であり、>は簡単な反復単位を表し、「 」は下記のオリゴヌクレオチド2と相補的な配列が隣にある短い(8~10)ヌクレオチドを示す。

3' - _____ S3- 5'

ここで、S3は酵素E3についての第3の制限部位であり、構築の際に使用されるベクターに存在する。その方法では次の段階を行う。(1)オリゴヌクレオチド1および2をアニーリングする；(2)アニーリングされたオリゴヌクレオチドを埋めて、二本鎖(ds)配列を得る；(3)二本鎖DNAを制限酵素E1およびE3で開裂させ、次に、同じ酵素E1およびE3で開裂させてあったベクター(例：pUC19または酵母ベクター)に連結する；(4)制限酵素E1およびE3で消化さ

せることで、プラスミドの第1の部分から挿入物を単離し、プラスミドの第2の部分(酵素E2(3')の突出を除くための処理)およびE3で切断し、大きい断片(プラスミドDNAと挿入物)を単離する；(5) 2個のDNA断片(S1～S3挿入物断片とベクター+挿入物)を連結する；(6) 段階4および5を必要回数繰り返して、所望の反復配列の大きさとする。各延長サイクルで、反復配列の大きさは倍化する。すなわち、mを延長サイクルの回数とすると、反復配列の大きさは $k \times 2^m$ ヌクレオチドとなる。

図面の説明

図1は、MMCneo [ミニ染色体] 染色体の生成を描いた模式図である。A～Gは、当該ミニ染色体の形成および安定化に至ると考えられる観察データと一致する連続事象を表す。

図 2 には、認められた新たな染色体の生成形態の模式的概要と、異なるデノボ生成染色体間の関係を示してある。詳細にはこの図は、マウス 7 番染色体の動原体領域で開始するデノボ染色体形成の模式図を示している。(A) 7 番染色体の動原体領域における 1 回の E 型増幅によって、組み込まれた「外来」DNA に連

結した neo-動原体が形成され、二動原体染色体が

形成される。複数回の E 型増幅によって、 λ neo-染色体が形成され、それは二動原体染色体の動原体間の特異的切断によって、マウス 7 番染色体の残りの部分から分離され、マウス-ハムスター雑種細胞系で安定化した。(B) 二動原体 7 番染色体の動原体間の特異的切断によって、neo-動原体を有する染色体断片と、末端に異種 DNA の痕跡を有する 7 番染色体が生成する。(C) neo-動原体を有する断片の反転複製によって、安定な neo-ミニ染色体が生成する。(D) 元二動原体 7 番染色体の異種 DNA 領域への外来 DNA の組み込みによって H 型増幅が開始し、異質染色質腕が生成する。真正染色質末端部分を捕捉することで、その新たな染色質腕が「ソーセージ」染色体の形で安定化する。(E) BrdU [5-ブロモデオキシウリジン] 処理および/または薬剤選別によって、さらに H 型増幅が誘発され、それによって不安定なギガ染色体が生成する。(F) BrdU 処理および/または薬剤選別を繰り返すことで、動原体複製を含むさらなる H 型増幅が誘発され、それによってさらに別の染色質腕が生成する。それは染色体切断によって 7 番染色体から切り離され、末端部分を獲得することで、安定なメガ染色体が生成する。

図 3 は、レプリコン構造の模式図であって、メガ染色体が生成すると考えられる図式である。

図 4 は、本明細書に記載の細胞系列の一部のものの間の関係を説明する図である。

図 5 は、プラスミド pTEMPUD の図である。

好ましい実施態様の詳細な説明

定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有するものとする。本明細書で引用の全ての特許および刊行物は引用によって本明細書に含まれるものとする。

本明細書で使用する場合、哺乳動物人工染色体〔MAC〕とは、内因性染色体とともに、安定に複製および分離できるDNA片である。それは、染色体に挿入された異種遺伝子を収容および発現できるものである。それは活性な哺乳動物動原体を有することから、哺乳動物人工動原体と称する。植物人工染色体、昆虫人工染色体および鳥人工染色体は、それぞれ植物および昆虫の動原体を含む染色体と称する。ヒト人工染色体〔HAC〕

とは、ヒト動原体を含む染色体を指し、BUGACとは昆虫人工染色体を指し、AVACとはトリ人工染色体を指す。本発明で提供されるMAC中、SATAC、ミニ染色体およびin vitro合成人工染色体がある。各種の構築方法が本発明で提供される。

本明細書で使用する場合、in vitro合成人工染色体とは、必須構成要素（少なくとも動原体、複製源）をin vitroで結合することで得られる人工染色体である。

本明細書で使用する場合、内因性染色体とは、MACの形成または導入以前に細胞で認められるゲノム染色体を指す。

本明細書で使用する場合、安定な染色体維持とは、約85%以上、好ましくは90%、より好ましくは95%の細胞が染色体を保持する場合のものである。安定性は、選択剤の存在下に測定する。好ましくは、それらの染色体は、選択剤不在下でも維持される。安定な染色体はさらに、細胞培養時にその構造を保持し、染色体内や染色体間の再配列を起こすことがない。

本明細書で使用する場合、選択条件下での成長とは、生残についての選択可能マーカーの発現を必要とする条件下での細胞の成長を意味する。

本明細書で使用する場合、染色体を不安定化させる薬剤は、増幅事象、突然変異を促進することが、当業者には公知のいずれかの薬剤である。BrdUを含むそのような薬剤は、当業者には公知である。

本明細書で使用する場合、動原体に関して「デノボ（新規の）」という用語は、本発明の方法を用いて異種DNA断片を組み込んだことで生じる過剰の動原体

形成を指す。

本明細書で使用する場合、真正染色質および異質染色質は、それらの一般に認められた意味を有する。すなわち真正染色質は、広範に染色し、代表的には遺伝子を含む染色質を指し、異質染色質とは、異常に凝縮したままで、転写的には不活性であると考えられている染色質を指す。少なくとも哺乳動物細胞に関して、非常に反復性の高いDNA配列〔付随DNA〕は通常、動原体周囲の異質染色質〔挟動原体異質染色質〕の領域にある。構成異質染色質とは、構成上凝縮しており、遺伝的に不活性である非常に反復性の高いDNAを含む異質染色質を指す。

本明細書で使用する場合、BrdUとは、複製時にチミジンに代わって挿入される5-ブロモデオキシウリジンを指す。

BrdUは、突然変異原として使用される。それはさらに、細

胞分裂時の中期染色体の凝縮を阻害する。

本明細書で使用する場合、二動原体染色体とは、2個の動原体を有する染色体である。多動原体染色体は、2個より多い動原体を有する。

本明細書で使用する場合、元二動原体染色体とは、二動原体染色体が断片化し、新たな末端小粒を獲得することで、それぞれが一方の動原体を有する2個の染色体を生成する時に生成する染色体である。各断片は複製可能な染色体である。染色体の一方について真正染色質DNAの増幅を行って、新たに導入された異質DNAおよび主として〔少なくとも50%超〕真正染色質を含む完全に機能性の染色体が得られる場合、それはミニ染色体である。残りの染色体は、元二動原体染色体である。一方の染色体について増幅を行うことで、異質染色質〔付随DNA〕が増幅され、真正染色質部分〔または腕〕が残っている場合、それはソーセージ染色体と称される。異種DNAの部分を除く実質的に全ての異質染色質である染色体はSATACと称される。そのような染色体〔SATAC〕は、BrdU処理および／または選択条件下での増殖のように、染色体を不安定化させることで、付随人工染色体〔SATAC〕を生成する条件

下でソーセージ染色体を含む細胞を培養することで、ソーセージ染色体から生成

することができる。本明細書に関しては、S A T A Cは必ずしも複数段階で生成するとは限らないが、最初に異種DNAを導入し、選択条件下に成長させた後に生じるか、あるいは選択条件下でのいくつかの成長サイクルおよびB r d U処理後に生じ得るものであることは明らかである。

本明細書で使用する場合、S A T A Cとは異種DNAの部分を除く実質的に全て異質染色質である染色体を指す。代表的には、S A T A Cは不随DNAに基づく人工染色体であるが、その用語は、真正染色質より異質染色質を多く含む本発明の方法によって得られる染色体を含むものである。

本明細書で使用する場合、染色体に関して使用する際、特に本発明によって提供されるS A T A C形成方法について使用する際の「増幅可能」という用語は、増幅を起こしやすい染色体領域を指す。増幅は代表的には、複製および他の組換えが関与する細胞事象の際に生じる。そのような領域は代表的には、付随DNA、r DNAおよび他のそのような配列などの縦列反復を含む染色体領域である。

本明細書で使用する場合、DNAに関しての「増幅」とは、

DNAの部分複製して、実質的に縦列もしくは連続反復単位または反転反復単位としてつながっているのが普通の同一もしくはほぼ同一のDNA部分の2個以上のコピーを生じるプロセスである。

本明細書で使用する場合アンプリコンとは、メガレプリコンの1組の反転反復単位を有する反復DNA増幅単位である。メガレプリコンは、比較的高次の複製単位を代表するものである。

例えば、S A T A Cに関して、メガレプリコンは、それぞれが非付随DNAの隣接する付随DNAを有する1組の縦列DNAブロックを有する。挟動原体異質染色質および恐らくは動原体の複製の調整および促進に関与すると考えられるメガレプリケータと称される一次複製部位が、メガレプリコン内にある。メガレプリコン内には、相対的に小さい〔例：一部の哺乳動物細胞で50～300kb〕二次レプリコンがある場合がある。例示のS A T A Cでは、メガレプリコンは、2個の約7.5Mbの縦列DNAブロックによって決定されている〔例えば図3参

照〕。各人工染色体〔AC〕内で、あるいはその群において、各アンプリコンはほぼ同じ構造を有するが、配列が異なっている場合がある。そのような配列の差異は、特に培養時に生じる

移動性遺伝要素の運動、欠失もしくは挿入または突然変異の結果生じるものである。そのような差異は、本明細書に記載のACの使用やその全体的構造に影響を与えるものではない。

本明細書で使用する場合、リボソームRNA〔rRNA〕とは、リボソーム構造の一部を形成し、蛋白合成に関与する特殊化したRNAである。リボソームRNAは、真核生物細胞において複数コピーに存在する遺伝子の転写によって産生される。ヒト細胞においては、一倍体ゲノム当たり約250コピーのrRNA遺伝子が、5以上の異なる染色体（13、14、15、21および22番染色体）上のクラスターで広がっている。マウス細胞では、リボソームDNA〔rDNA〕の存在は、20個のマウス染色体中の11以上の対〔5、6、9、11、12、15、16、17、18、19番染色体およびX染色体〕で確認されている（Rowe et al (1996) Mamm. Genome 7:886-889およびJohnson et al (1993) Mamm. Genome 4:49-52参照）。真核生物細胞では、高度に保存されたrRNAの複数コピーが、縦列に配置された一連のrDNA単位にあり、該rDNA単位は長さが約40～45 kbであり、転写領域ならびに長さおよび配列において多様であり得るスペーサ（すなわち、遺伝子間

スペーサ）DNAとして知られる非転写領域を有する。ヒトおよびマウスにおいて、これらの縦列配置のrDNA単位は、挟動原体付随DNA配列（異質染色質）に隣接している。rDNAがあるこれら染色体領域は、核小体形成部位（NOR）と称され、細胞核中のリボソーム産生部位である核仁に輪状に存在する。

本明細書で使用する場合、ミニ染色体とは、異質染色質DNAより多くの真正染色質DNAを含む多動原体染色体、代表的には二動原体染色体（例えば図1参照）由来の染色体を指す。

本明細書で使用する場合、メガ染色体とは、導入された異種DNAを除き、実

質的に異種染色質から構成される染色体を指す。メガ染色体は、導入された異種DNAに隣接する2個の反転メガレプリコンを有する反復アンプリコン配置からなる（例えば、メガ染色体の模式図については図3参照）。本発明に関しては、メガ染色体は、約50～400Mb、一般には約250～400Mbである。相対的に短いものは切断メガ染色体〔約90～120もしくは150Mb〕、矮小メガ染色体〔約150～200Mb〕および細胞系、ならびにマイクロメガ染色体〔約50～90Mb、代表的には50～60Mb〕とも称される。

本発明に関しては、メガ染色体という用語は、いずれかの挿入異種DNAに隣接する2個の反転メガレプリコンを有する反復染色体部分〔アンプリコン〕の配に基づいた全体的に反復性の構造を指す。その大きさを指定する。

本明細書で使用する場合、遺伝子治療には、ある種の細胞すなわち標的細胞への異種DNAの転移もしくは挿入による、疾患の改善もしくは調節に関与する具体的な遺伝子産生物の取得が関与する。異種DNAが発現され、それによってコードされた産生物を産生するような形で、特定の標的細胞に、そのDNAを導入する。別法として、異種DNAは何らかの形で、治療性生成物をコードするDNAの発現に介在する。それは、何らかの形で、直接もしくは間接に治療性生成物の発現に介在する、ペプチドもしくはRNAなどの生成物をコードすることができる。さらに、遺伝子治療を用いて、宿主では通常は産生されないか、あるいは治療上有効な量または治療上有用な時期に産生されないTNFなどの治療性化合物を導入することも可能である。標的細胞によって疾患を患っている生体内でのその標的細胞による異種DNAの発現によって疾患の調節を行うことができる。治療性生成物をコードする異種DNAに修飾を行ってか

ら、疾患を患っている宿主の細胞に導入して、その産生物もしくは発現を促進その他の形で変えることができる。

本明細書で使用する場合、異種または外来のDNAおよびRNAは互換的に使用され、天然に生じるものとは異なるゲノムの位置に存在もしくは認められるゲノムの一部として天然には生じないDNAまたはRNAを指す。それは、細胞に

対しては内因性ではなく、細胞に外部から導入されたDNAもしくはRNAである。異種DNAの例としては、遺伝子治療またはコードされた蛋白の産生を目的として導入された、対象とする遺伝子産物または複数の遺伝子産物をコードするDNAなどがあるが、それに限定されるものではない。異種DNAの他の例としては、薬剤耐性を与える蛋白などの追跡可能なマーカー蛋白をコードするDNA、抗癌剤、酵素およびホルモンなどの治療上有効な物質をコードするDNA、抗体などの他の種類の蛋白をコードするDNAなどがあるが、それらに限定されるものではない。異種DNAによってコードされる抗体は、その異種DNAを導入した細胞の表面で分泌または発現され得る。

本明細書で使用する場合、治療上有効な生成物とは、DNAを宿主に導入した際に、先天性疾患もしくは後天性疾患の症状、

発現を効果的に緩和もしくは解消する生成物またはその疾患を治癒させる生成物が発現される異種DNAによってコードされた生成物である。

本明細書で使用する場合、遺伝子導入植物とは、異種もしくは外来DNAが発現される植物、あるいは植物に天然に存在する遺伝子の発現に変化が生じた植物を指す。

本明細書で使用する場合、プロモーター、エンハンサー、転写・翻訳終止部位、他の信号配列などのヌクレオチドの調節配列およびエフェクタ配列に対する異種DNAの機能的（operative）連結とは、そのようなDNAとそのようなヌクレオチド配列との間の関係を指す。例えば、プロモーターに対する異種DNAの機能性連結とは、そのようなDNAの転写が、読み取り枠でそのDNAの認識、結合および転写を行うRNAポリメラーゼによって、プロモーターから開始するような、異種DNAとプロモーターの間の物理的関係を指す。好ましいプロモーターには、哺乳動物腺特異的プロモーターなどの組織特異的プロモーター；TK、CMV、アデノウイルスプロモーターなどのウイルスプロモーター；ならびに当業者に公知の他のプロモーターなどがある。

本明細書で使用する場合、単離された実質的に純粋なDNAとは、当業者が用

いる標準的方法に従って精製されるDNA断片を指す（例えば、Maniatis *et al.* (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYにあるもの）。

本明細書で使用する場合、発現とは、核酸がmRNAに転写され、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白に翻訳されるプロセスを指す。核酸がゲノムDNA由来のものである場合、適切な真核生物宿主細胞または生体を選択すると、発現にはmRNAのスプライシングが含まれる場合がある。

本明細書で使用する場合、ベクターもしくはプラスミドは、異種DNAの発現またはクローニングされた異種DNAの複製のいずれかを目的として細胞中に異種DNAを導入するのに使用される別個の要素を指す。そのようなベクターおよびプラスミドの選択および使用は、当業界の技術レベルの範囲内である。

本明細書で使用する場合、形質転換／トランスフェクションとは、DNAまたはRNAを細胞に導入するプロセスを指す。トランスフェクションとは、実際にいずれのコード配列が発現されるかとは無関係に、宿主細胞による発現ベクターなどの外

来核酸の取り込みを指す。多くのトランスフェクション法が当業者には知られており、例えば、リン酸カルシウムを用いた直接取り込み [CaPO₄; 例えば、Wigler *et al.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76:1373-1376]、ポリエチレングリコール [PEG] 介在DNA取り込み、エレクトロポレーション、リポフェクション [例えば、Strauss (1996) Meth. Mol. Biol. 54:307-327]、微小核体融合 [実施例参照、さらにはLambert (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:5907-5911; 米国特許 5 3 9 6 7 6 7 号; Sawford *et al.* (1987) Somatic Cell Mol. Genet. 13:279-284; Dhar *et al.* (1984) Somatic Cell Mol. Genet. 10:547-559; および McNeill-Killary *et al.* (1995) Meth. Enzymol. 254:133-152 参照]、脂質介在キャリア系 [例えば、Teifel *et al.* (1995) Biotechniques 19:79-80; Albrecht *et al.* (1996) Ann. Hematol. 72:73-79; Holmen *et al.* (1995) In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 31: 347-351; Remy *et al.* (1994) Bioconj. Chem. 5:647-654; Le Bolch *et al.* (1995) Tetrahedron Lett. 36:6681-6684; Loe

ffler et al. (1993) Meth. Enzymol. 217:599-618参照] その他の好適な方法によって行うことができる。トランスフェクションが奏功し

たか否かは、宿主細胞内でのベクターの機能指示などの、トランスフェクションした細胞内での異種核酸の存在検出によって確認されるのが普通である。形質転換とは、DNAを生体に導入して、そのDNAを、染色体外要素としてあるいは染色体組み込みによって複製可能とすることを意味する。

本明細書で使用する場合、「注入（された）」とは、細胞へのDNAの微量注入〔小型注射器を使用〕を指す。

本明細書で使用する場合、実質的に均一なDNAとは、別のそのような配列と十分類似していて、特定条件下に安定なハイブリッドを形成するヌクレオチド配列を含むDNAを指す。

同じ条件下に、異なる配列を有する核酸断片が検出可能な形で同一の「標的」核酸にハイブリダイゼーションし得ることは当業者には公知である。1個の断片が、他の核酸断片における1以上の部分の配列に対して相補的（またはほぼ相補的）である配列に少なくとも約14のヌクレオチドを有する部分を持つことから、十分長いハイブリダイゼーション期間にわたって緊縮条件下では、2個の核酸断片は検出可能な形でハイブリダイゼーションする。ハイブリダイゼーションが起こり得る時間が、所定の緊縮条件下に、正確に相補的な塩基対合部分を有す

る2個の核酸断片が検出可能な形で互いに対してハイブリダイゼーションするだけの時間で一定に保たれた場合、正確な相補性からの逸脱が塩基対合部分にあっても良く、そのような場合であっても、塩基対合はハイブリダイゼーションを検出可能とするのに十分な程度に起こる。2個の核酸の塩基対合部分間の相補性からの逸脱が大きくなり、ハイブリダイゼーション条件がさらに厳しくなるに連れて、2個の部分が検出可能な形で互いに対してハイブリダイゼーションする確率が低下する。

2個の一本鎖核酸部分は、（a）その両方が同一部分と塩基対合二体鎖を形成し、（b）前記2つの二体鎖の0.5×SSPE溶液での融点差が10℃未満で

ある場合、それらの部分は本明細書の意味の範囲内で、「実質的に同一の配列」を有する。比較する部分が同数の塩基を有して、「実質的に同じ配列」を有するという場合、それは代表的には10個中1個未満の配列が異なるというものである。核酸二体鎖の融点測定方法は公知である〔例えば、Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284およびその文献中で引用の参考文献を参照)。

本明細書で使用する場合、核酸プローブとは、同一もしくは非常に関係の深いヌクレオチド配列を有するDNAもしくはR

NAに対して特異的にハイブリダイゼーションするだけの数のヌクレオチドを有するDNA断片もしくはRNA断片である。プローブは、約10という少数から数十万という多数のヌクレオチドまで、いかなる数のヌクレオチドを有していても良い。そのようなハイブリダイゼーション反応の条件およびプロトコールは、プローブの大きさ、温度、不適正対合の程度、塩濃度およびハイブリダイゼーション反応についての他のパラメータの効果のように、当業者には公知である。例えば、ハイブリダイゼーションを行う場合の温度が低く、塩濃度が高いほど、ハイブリッド分子中に存在する不適合対合の程度は大きくなる。

ハイブリダイゼーションプローブとして使用するには、核酸を例えば³²P、³Hおよび¹⁴Cなどの検出可能な部分もしくは標識で標識することで、またはウラシル部分の5'位でビオチン化されたデオキシウリジレートの存在下でのニック翻訳などの化学的標識のような他の手段によって検出できるようにするのが普通である。得られたプローブには、チミジレート残基に代わってビオチン化ウリジレートがあり、ストレプトアビジンのビオチンへの結合に基づく多くの市販検出システムのいずれかによって検出することができる（ビオチン部分を介して）。

そのような市販の検出システムは、エンゾ・バイオケミカルズから入手可能である（Enzo Biochemicals, Inc., New York, NY）。非放射能標識などの当業者に公知の他の標識は、それがプローブを十分検出可能とする限りにおいて使用可能であり、それはアッセイの感度、使える時間〔細胞培養、DNA抽出およびハイ

ブリダイゼーションアッセイに対して]、プローブ源として利用可能なDNAもしくはRNAの量、特定の標識およびその標識を検出するのに使用される手段によって決まる。

プローブに対して十分高い程度で相同性を有する配列が確認されたら、それは標準法（例えばManiatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載のもの）によって容易に単離することができる。

本明細書で使用する場合、DNA分子が安定なハイブリッドを形成し、実質的に相同性であると考えられる条件とは、少なくとも約60%の相補性を有するDNA分子が安定なハイブリッドを形成するような条件を言う。そのようなDNA断片はこの場合、「実質的に相同」とであると考えられる。例えば、特定の蛋白をコードするDNAは、そのDNAが安定なハイブリッド

を形成して、断片の配列が少なくとも約60%相補的である場合、ならびにDNAによってコードされる蛋白がその活性を保持する場合に、別のDNA断片に対して実質的に相同である。

本明細書に関して、緊縮条件は以下のように規定される。

- 1) 高緊縮性: 0.1×SSPE、0.1% SDS、65℃
- 2) 中緊縮性: 0.2×SSPE、0.1% SDS、50℃
- 3) 低緊縮性: 1.0×SSPE、0.1% SDS、50℃

あるいは、塩および温度ならびに他の試薬の組み合わせによって、同程度の不適合または適合を選択することができる。

本明細書で使用する場合、「免疫保護（性）」とは、ワクチンまたは抗原もしくは免疫誘発剤への曝露が、ワクチンもしくは抗原を投与もしくは導入した宿主に対して、疾患の原因となる病原体による感染に抵抗する能力または症状を軽減させる能力を与えることができる能力を指す。選択される抗原は、病原体によって提供される抗原であるのが普通である。

本明細書で使用する場合、ハイブリダイゼーション反応および抗体-抗原反応などの全てのアッセイおよび手順は、別段の断りがない限り、当業者が標準的条

件と考える条件下に実施する。

A. MACを含む細胞系の製造

1. メガレプリコン

本発明で提供される方法、細胞およびMACは、動原体領域に比較的高次の複製単位〔メガレプリコン〕が存在することを発見したことによって得られたものである。このメガレプリコンは、一次複製開始部位〔メガレプリケート〕を境界とし、動原体異質染色質および最も可能性の高いものとして動原体の複製を促進するように思われる。異種DNAのメガレプリケート領域またはそのごく近くへの組み込みによって、メガ塩基サイズの染色体部分の大量増幅が開始し、それによって生存細胞においてデノが染色体形成が起こるようになる。

好ましいメガレプリケートを提供するDNA配列は、リボソームRNA (rRNA)を生じるrDNA単位である。哺乳動物、特にマウスおよびヒトでは、そのrDNA単位には、複製源（またはマウスにおける二方向複製源、すなわちOBR）ならびに増幅促進配列（APS）および増幅制御要素（ACE）などの特殊化要素がある（例えば、Gogel et al. (1996) *Chromosoma* 104:511-518; Coffman et al. (1993) *Exp. Cell. Res.* 209:123-132; Little et al. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13:6600-6613; Yoon et al. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:2482-2489;

Gonzalez and Sylvester (1995) *Genomics* 27: 320-328; Miesfeld and Arnheim (1982) *Nuc. Acids Res.* 10:3933-3949; Maden et al. (1987) *Biochem. J.* 246:519-527参照)。

上記のように、理論は別として、これらの特殊化要素は、細胞における本明細書に記載のような染色体のデノ形成で、メガ塩基の大きさの染色体部分の複製および／または増幅を促進することができる。これらの特殊化要素は代表的には、rDNAの転写領域の上流にある非転写遺伝子間スペーサ領域にある。遺伝子間スペーサ領域はそれ自体、縦列に反復したブロックおよび非縦列ブロックとして分類することができる反復配列を内部に有し得るものである（Gonzalez and Sylvester (1995) *Genomics* 27:320-328参照）。マウスrDNAでは、二方向複

製源は、転写開始部位の約1.6 kb上流を中心とする3 kbの開始ゾーン内に認めることができる（例えば、Gogel *et al.*, (1996) *Chromosoma* 104:511-518 参照）。これらの特殊化要素の配列は、例えばヌクレアーゼ過敏または曲がったDNA構造を生じ得るA/T豊富領域の存在によって検出可能な、変化した染色質構造を有する傾向がある。複製源を含む配列の例が、ほぼ位置2430～5435で配列番号16およびGENBAN

K受託番号X82564に示してある。増幅促進配列を含む配列の例としては、配列番号16のヌクレオチド690～1060および1105～1530などがある。

ヒトrDNAでは、一次複製開始部位は、転写領域上流の数キロ塩基対に認められ、二次開始部位は、非転写遺伝子間スペーサ領域全体に認められる（例えば、Yoon *et al.*, (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:2482-2489参照）。完全なヒトDNA反復単位は、GENBANKに受託番号U13369で示されており、本明細書では配列番号17に示してある。複製開始部位を含む別の配列例は、配列番号17のヌクレオチド35355～42486の配列内、特にヌクレオチド37912～42486の配列内、さらに詳細には配列番号17のヌクレオチド37912～39288の配列内にある（Coffman *et al.*, (1993) *Exp. Cell. Res.* 209:123-132参照）。

MACを含む細胞系は、細胞、好ましくは安定な細胞系を、選択可能なマーカーをコードする異種DNA断片で形質転換し；選択条件下に培養し；多動原体染色体、好ましくは二動原体染色体を有する細胞を確認することで得ることができる。その細胞を次に、本明細書に記載の方法に従って操作して、本明

細書に記載のようなミニ染色体および他のMAC、特に異質染色質SATACを生成することができる。

多動原体染色体、特に二動原体染色体の形成は、挟動原体異質染色質、好ましくはrDNA配列を有する染色体の動原体領域における異種DNAの組み込みによって行われるのが普通である。そこで、取り込みの頻度は、選択可能なマ

カーをコードする異種断片における rDNA または付随 DNA などの（これらに限定されるものではないが）DNA 等によって、それらの領域を標的とすることで上昇させることができる。異種 DNA を挟動原体異質染色質に向かわせるための好ましい標的配列には、rRNA 遺伝子を有する染色体の動原体領域を標的とする rDNA 配列がある。そのような配列には、配列番号 16 および GENBANK 受託番号 X82564 の DNA およびその一部、配列番号 17 および GENBANK 受託番号 U13369 の DNA およびその部分、配列番号 18～24 の DNA などがあるが、これらに限定されるものではない。異種 DNA を染色体 rDNA に組み込む上で使用される配列番号 16 内からの DNA を組み込む特定ベクターは、pTERPUD である（実施例 12 参照）。付随 DNA 配列を用いて、異種 DNA

を挟動原体異質染色質に組み込むこともできる。例えば、マウスおよびヒトの付随 DNA をそれぞれ有するベクター pTEMPUD および pHASPU D が、デノボ人工染色体形成のために異種 DNA を細胞に導入するためのベクター例として本明細書にある（実施例 12 参照）。

次に、得られた細胞系を本発明で例示の細胞同様に処理して、二動原体染色体が断片化した細胞を得ることができる。次に、その細胞を用いて、別の選択的マーカーを断片化二動原体染色体（すなわち、元二動原体染色体）に導入して、挟動原体異質染色質を増幅して、異質染色質染色体を得ることができる。

以下の考察では、EC3/7 細胞系と得られる細胞を参照して、このプロセスについて説明する。他の細胞、特に細胞系に対して同じ手順を適用して、SATAC および真正動原体ミニ染色体を得ることができる。

2. デノボ染色体の形成

ヒトおよび細菌の DNA を有する λ 構築物 [λ CM8 および λ gtWESneo] の同時組み込み後の形質転換マウス LMTK⁻線維芽細胞系 [EC3/7] でのデノボ動原体形成 [Hadlaczky *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:

8106-8110および米国特許出願08/375271号参照)が報告されている。

「異種」操作ヒト、細菌およびファージDNAの組み込みと、その後のマウスおよび異種DNAの増幅による二動原体染色体形成が、マウス染色体の短腕の動原体領域で起こった。G分染によって、この染色体はマウス7番染色体であることが確認された。同じ染色体上に2個の機能的に活性な動原体が存在することから、動原体間では一定の切断が起こる。そのような特異的染色体切断によって、neo-動原体を有する染色体断片が認められるようになった(細胞の約10%で)。EC3/7細胞系[受託番号90051001でEuropean Collection of Animal Cell Culture (以下E C A C Cと称する)に寄託された米国特許5288625号参照;Hadlaczky et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:8106-8110および米国特許出願08/375271号ならびに相当する公開欧州出願EP0473253号も参照]から、2つの亜細胞系[EC3/7C5およびEC3/7C6]を反復単一細胞クローニングによって選別した。これらの細胞系では、neo-動原体は専らミニ染色体[neo-ミニ染色体]で認められたが、元二動原体染色体には「異種」DNAの痕跡を有していた。

現在、動原体の異質染色質領域への選択可能マーカーをコードするDNAの組み込みによって二動原体染色体が形成されたことがわかっている。

3. neo-ミニ染色体

neo-動原体をマウス染色体から分離するEC3/7細胞での染色体切断がGバンド陽性「異種」DNA領域で起こった。これは、元二動原体染色体の切断末端にλおよびヒトDNA配列の痕跡が認められたことで裏付けられる。neo-動原体を有する染色体断片のGバンドパターンを安定なneo-ミニ染色体のものと比較することで、neo-ミニ染色体が、neo-動原体を有する染色体断片の反転複製物であることが明らかである。これは、neo-ミニ染色体が機能性動原体1個のみを有するが、ミニ染色体のいずれの末端も異質染色性であり、in situハイブリダイゼーションによって、これらの異質染色性領域においてマウス付随DNA配列が認められたことで裏付けられる。

例示の実施例ではλDNAおよびネオマイシン耐性遺伝子である異種DNAの

複数反復単位を有するミニ染色体を含むマウス細胞を、細胞形質転換における受容細胞として用いることが

できる。ハイグロマイシン (hygromycin) 耐性を与えるハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ [h y g] をコードする遺伝子などの第2の選択可能マーカーに連結されたλ DNAを有する特定の異種DNAなどのドナーDNAをマウス細胞に導入し、ドナーDNA中のλ DNAをミニ染色体におけるものと相同的に組み換えることで、ミニ染色体に組み込むことができる。組み込みは、in situ ハイブリダイゼーションおよびサザンブロッティング分析によって確認される。異種DNAの転写および翻訳は、プライマー延長および免疫ブロッティング分析によって確認される。

例えば、やはりハイグロマイシン耐性をコードするDNAおよびサイトメガロウイルス [CMV] 初期プロモーターなどのプロモーターに連結したRenillaルシフェラーゼ遺伝子ならびに細菌性ネオマイシン耐性コードDNAを含有するλ DNA構築物 [p N e m 1 r u c] を用いて、EC3/7C5細胞で、DNAがneo-ミニ染色体に導入されている。特定の細胞 [PHN4と称される] における染色体へのドナーDNAの組み込みか、核酸増幅 [PCR] およびin situ ハイブリダイゼーションによって確認されている。neo-ミニ染色体を生じると

考えられる事象を図1に描いてある。

異種DNAを含む得られた遺伝子操作ミニ染色体は次に、チャイニーズハムスター卵巣細胞 [CHO] などの受容細胞系への細胞融合によって転移させることができ、異種DNAの正しい発現を確認することができる。細胞生産に続いて、例えばコルヒチンを加えることで中期染色体を得て、二重レーザー光に基づくセルソーターでAT特異染料およびGC特異染料を加えることで染色体を精製する (人工染色体の単離方法の説明については、実施例10B参照)。純度95%以上の分取量の染色体 [染色体 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ 個/mL] が得られる。得られた染色体を用いて、微量注入およびリボソーム介在転移などの方法によって、

細胞に導入する。

そうして、neo-ミニ染色体は細胞中で安定に維持され、自己複製し、非選択的培養条件下でneo遺伝子の持続的な長期発現を可能とする。それはさらに、対象DNAの相同的組み換えおよび組み込みのための標的部位として役立つメガ塩基の公知の異種DNA [例示の実施態様におけるλDNA] も有する。そこでneo-ミニ染色体は、細胞の遺伝子操作のためのベクターとなる。それをSCIDマウスに導入したところ、内

因性染色体と同様に複製することが明らかになっている。

本発明の方法は、選択的マーカー [好ましくは、優性の選択可能マーカー] を有する異種DNAを細胞に導入し、選択条件下にその細胞を培養することで、neo-ミニ染色体を形成する事象を誘発する手段を提供するものである。結果的に、増幅によって生じる多動原体染色体 (例えば二動原体染色体) およびその断片を有する細胞が得られる。次に、二動原体染色体を有する細胞を、BrdUなどの薬剤で処理するおよび/あるいは選択条件下で培養することで染色体を不安定化させて、二動原体染色体が2個の染色体を生成する細胞を得ることができる。その2個の染色体は、いわゆるミニ染色体と元二動原体染色体であり、後者は通常、異種DNAが組み込まれた異質染色質中で増幅されて、SATACまたはソーセージ染色体を与える [これについては後述する]。その細胞を他の細胞と融合させて、ミニ染色体を元二動原体染色体から分離して別の細胞に導入して、各種のMACを別個に操作することができる。

4. SATACの製造

SATAC製造のためのプロトコル例を図2 [特にD、EおよびF] および図3 [実施例、特に実施例4～7も参照] に

図示してある。

SATACを得るには、出発原料は細胞、好ましくは線維芽細胞系などの安定な細胞系および選択的マーカーをコードするDNAを含むDNA断片である。リン酸カルシウムを用いる直接取り込み、エレクトロポレーションおよび脂質介在

転移などの（これらに限定されるものではないが）DNA転移方法によって、DNA断片を細胞に導入する。異質染色質におけるDNA断片の組み込みを確実にを行うには、 λ CM8ならびに付随DNAを含むpTEMPUD [図5] および pHASPU [実施例12参照] のような本発明で提供されるベクターなどの染色体の挟動原体異質染色質領域に、あるいは具体的にはrDNA配列を有する染色体の動原体領域におけるrDNAに導入されるDNAを原料とするのが好ましい。DNAを導入した後、細胞を選択条件下で成長させる。得られた細胞について調べて、多動原体染色体、特に二動原体染色体 [または異質染色質染色体またはソーセージ染色体その他のそのような構造;図2D、2Eおよび2F参照] を選別する。

詳細には、二動原体染色体を有する細胞を選別した場合、それを選択条件下で成長させることができるか、あるいは好まし

くは、第2の選択可能マーカーをコードする別のDNAを導入し、その第2のマーカーに対して選択的な条件下に細胞を成長させる。得られた細胞には、図2D、2Eおよび2Fに図示したものと同様の構造を有する染色体が含まれているはずである。図2Dのソーセージ染色体のような構造を有する細胞を選別し、第2の細胞系と融合させて、対象外の他の染色体を除去することができる。所望に応じて、他の染色体を有する細胞を選別し、本明細書に記載の方法に従って処理することができる。ソーセージ染色体を有する細胞を選別した場合、それをBrdUなどの薬剤で処理して、染色体を不安定化させて、異質染色質腕が実質的に異質染色性である染色体 [すなわち、メガ染色体。図2F参照] を形成するようにすることができる。異質染色質腕を増幅したがneo-染色質腕から切り離していないギガ染色体などの構造も認められる。メガ染色体は安定な染色体である。融合および選択条件下での増殖および/またはBrdU処理その他のそのような処理等のさらなる操作を行って、メガ染色体の断片化を行って、基本的反復単位としてアンプリコンを有する相対的に小さい染色体を形成することができる。

pTEMPUD [図5および実施例12参照]、pHASP

UDまたはpTERPUD（実施例12参照）などの染色体断片化ベクターを用いてメガ染色体をin vivoでさらに断片化して、最終的に、1～4個のメガレプリコンを含む約15Mb～60Mbの相対的に小さい安定な複製可能単位を有する染色体を得ることができる。

そうして、マウス7番染色体の短腕由来のデノボ生成した安定な染色体を分析した。この染色体領域は、大きい染色体部分の増幅能力を示し、デノボ染色体生成を促進する。同じ染色体領域での大量増幅によって、二動原体および多動原体染色体、ミニ染色体、150～200Mbの大きさのneo-染色体、「ソーセージ」染色体、500～1000Mbギガ染色体および安定な250～400Mbメガ染色体が生成する。

メガ染色体の腕に沿って明らかな分断が認められ、分析によって、この染色体の構成単位は、両末端に組み込まれた「外来」DNA配列を有するマウスの主要付随DNAから構成される約30Mbのアンプリコンであることが明らかになっている。その約30Mbアンプリコンは、約7.5Mbのマウス主要付随DNAブロックからなる2個の約15Mbの反転二重線からなり、それらは非付随配列の狭い帯によって互いに分離されてい

る〔例えば図3参照〕。アンプリコンの境界にある比較的広い非付随領域には組み込まれた外来〔異質〕DNAがあるが、アンプリコン内の非付随DNA配列の狭い帯は、マウス染色体の挟動原体異質染色質の重要な部分である。これらの結果は、非付随DNAに隣接する約7.5Mbのブロックがマウス染色体の挟動原体異質染色質の構成単位であり、マウス染色体の約15Mbの大きさの挟動原体領域には2個の約7.5Mb単位があることを示している。

真正染色質末端部分は別として、メガ染色体全体は異質染色性であり、構造的に均一である。従って、この大きい染色体は、増幅プロセスについてのデータを得る上で、さらには異種DNAにおけるベクターとしておよびさらなる断片化における標的として挟動原体構成異質染色質のいくつかの基本的特徴を分析する上で、ユニークな可能性を提供するものである。

本明細書に示すように、この現象は普遍的に起こるもので、他の染色体でも認

めることができる。さらに、これらのデノボ生成染色体部分および染色体は外観は異なっているが、同様の増幅機序がその生成においてある役割を果たしている。すなわち、(i) 各場合において、増幅はマウス染色体の動原体領域

で開始し、大きい (Mb の大きさ) アンブリコンが生成する。(i i) マウスの主要付随 DNA 配列は、異質染色質アンブリコンの大部分を提供するか [H 型増幅]、あるいは真正染色質アンブリコンに境界を設ける [E 型増幅] ことで、アンブリコンの一定の構成要素となる。(i i i) 反転部分の生成を、 λ neo-染色体およびメガ染色体で示すことができる。(i v) 増幅によって形成される染色体断片および染色体は、安定かつ機能性である。

反転染色体断片が存在することは、マウス 7 番染色体の動原体領域でデノボで形成される染色体において一般に見られると考えられる。neo-ミニ染色体生成の際、neo-動原体を有するマウス 7 番染色体の遠位部分の安定化を生じる事象が、その反転複製物の形成であった。メガ染色体のアンブリコンは、約 7.5 Mb のマウス主要付随 DNA ブロックの反転二本線である。

5. 細胞系

ミニ染色体、 λ neo-染色体および SATAC などの MAC を有する細胞系が本発明で提供されるか、あるいはそれを本発明の方法によって得ることができる。そのような細胞系は、

これら染色体の簡便な入手源を提供するものであり、細胞融合または特定細胞系との融合における微小核体の生産などによって操作して、対象とする染色体をハイブリッド細胞系に導入することができる。本明細書では細胞系の例を記載しており、一部は ECACC に寄託されている。

a. EC3/7C5 および EC3/7C6

細胞系 EC3/7C5 および EC3/7C6 を、EC3/7 の単一細胞クローニングによって得た。例を挙げると EC3/7C5 は ECACC に寄託されている。これらの細胞系には、EC3/7 からのミニ染色体および元二動原体染色体が含まれている。細胞系 EC3/7C5 および EC3/7C6 における安定なミ

ニ染色体は同一であるように思われ、それらは二動原体染色体の約10～15 Mbの「分裂」断片の複製誘導体であるように思われる。これらの独立に得られた細胞系でそれらの大きさが同様であることは、約20～30 Mbが、安定なミニ染色体の最小または最小に近い物理的大きさであることを示していると考えられる。

b. TF1004G19

第2の選択可能マーカー、ハイグロマイシンホスホトランス

フェラーゼ（すなわち、ハイグロマイシン耐性遺伝子）および検出可能なマーカーβ-ガラクトシダーゼ（すなわち、lacZ遺伝子）をコードするDNAなどの別の異種DNAをEC3/7C5細胞系に導入し、選択条件下に増殖させて、TF1004G19と称する細胞を得た。詳細にはこの細胞系は、抗HIVリボザイム（ribozyme）およびハイグロマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドpH132、pCH110〔β-ガラクトシダーゼをコード〕およびλファージ〔λc1875Sam7〕DNAとの共トランスフェクションおよびハイグロマイシンBによる選別によって、EC3/7C5細胞系から得られた。

λファージおよびプラスミドDNA配列を用いたin situハイブリダイゼーションによるTF1004G19細胞系の詳細な分析により、ソーセージ染色体の形成が明らかになった。EC3/7C5細胞系の元二動原体染色体を別の末端動原体染色体の末端に転座させた。異種DNAを元二動原体染色体の狭異質染色質に組み込み、メガ塩基のマウス挟動原体異質染色質付随DNA配列〔図2D〕を用いて数回増幅して、「ソーセージ」染色体を得る。その後、末端動原体マウス染色体を真正染色質末端小粒によって置換した。

ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のビオチン標識した小断片を用いたin situハイブリダイゼーションによって、ソーセージ染色体の異質染色質腕のみにハイブリッド信号が生じ、TF1004G19形質転換細胞では、これらの遺伝子が挟動原体異質染色質に局在していることが示された。

しかしながら、高レベルの遺伝子発現が検出された。異質染色質はショウジョウバエ、酵母で、さらにはマウス動原体で付随DNAに導入されたHSV-tk遺伝子に対して沈黙効果を有する。そこで、TF1004G19形質転換細胞系を調べて、異質染色質に局在する遺伝子が一般に認められている定説とは対照的に実際に発現したことが確認されたことは興味深いものであった。

それに関して、異なるソーセージ染色体〔図2D参照〕を有するTF1004G19のサブクローンを単一細胞クローニングによって得た。ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子とlacZ遺伝子の小断片を有するサブクローンから単離されたDNAのサザンハイブリダイゼーションから、ハイブリダイゼーションの強さとソーセージ染色体の長さとの間に密接な相関関係があることが明らかになった。この所見は、これ

らの遺伝子がソーセージ染色体の異質染色質腕に局在するという結論を裏付けるものである。

(1) TF1004G-19C5

TF1004F-19C5は、neo⁻ミニ染色体および安定な「ソーセージ」染色体を含むマウスLMTK⁻線維芽細胞系である。それは、TF1004G19のサブクローンであり、TF1004G19細胞系の単一細胞クローニングによって形成されたものである。それは、細胞系の例およびソーセージ染色体源の例としてECACCに寄託してある。その後、この細胞系とCHO K20細胞との融合を行い、ハイグロマイシンおよびG418およびHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン（aminopterin）およびチミジン培地；Szybalski *et al.*

（1962）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 48:2026参照）による選別を行って、ソーセージ染色体とneo⁻ミニ染色体を有するハイブリッド細胞（19C5×Ha4と称する）を得た。ハイブリッド細胞のBrdU処理とそれに続く単一細胞クローニングおよびG418および／またはハイグロマイシンによる選別によって、GB43およびGB3D5などの対象とする染色体を有する各種細胞を得た。

(2) 他のサブクローン

19C5×Ha4細胞をBr d U処理し、次にG418を含有する選択培地で成長させ、Br d Uで再度処理することで、細胞系GB43およびG3D5を得た。その2つの細胞系を、所定細胞の単一細胞クローニングによって単離した。GB43細胞にはneoミニ染色体のみが含まれている。ECACCに寄託したG3D5には、neoミニ染色体およびメガ染色体がある。この細胞系を単一細胞クローニングし、次にサブクローンをG418およびハイグロマイシンを含む培地で成長させて、neoミニ染色体およびメガ染色体を有するGHB42細胞系などのサブクローンを得た。H1D3は、メガ染色体を有するが、neoミニ染色体を持たないマウスーハムスターハイブリッド細胞系であり、19C5×Ha4細胞をBr d Uで処理し、次にハイグロマイシンを含む選択培地で増殖させ、特定細胞の単一細胞サブクローニングを行って得た。この細胞系を、やはり別の選択(selection)遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子をコードするDNAを有するCD4⁺HeLa細胞系と融合させて、メガ染色体とCD4neoを有するヒト染色体を持った細胞[H1×HE41細胞]を生成した。さらにB

r d U処理を行い、単一細胞クローニングを行うことで、切断メガ染色体を有する細胞を含む1B3などの細胞系を得た。

5. 細胞の転換に使用するDNA構築物

染色体製造時のいずれかの段階で、トランスフェクションその他の適切な方法によって、異種DNAを細胞に導入することができる[例えば図4参照]。一般に、そのようなDNAのMACへの導入は、異種DNAでのλ-DNAの封入(例示の染色体について)、および別の選択的マーカー遺伝子によって行うことができるように、部位指向性組み込みによって確保される。例えば、ミニ染色体またはSATACなどのMACを含む細胞は、HIVリボザイムをコードするDNA、嚢胞性繊維症遺伝子およびハイグロマイシン耐性などの第2の選択可能マーカーをコードするDNA等の所望の異種DNAを有するプラスミドと共トランスフェクションすることができる。次に、新たな選択可能マーカーを発現しない細胞には有害である薬剤に細胞を曝露することで、細胞に選択圧をかける。そのよ

うにして、異種DNAをMACに封入した細胞が確認される。第2の細胞系との融合によって、一つの特定の種類の染色体構造またはMACを有する細胞系を形成する手段を提供することができる。

本発明ではそのための各種ベクターが提供され【実施例参照】、他のものは容易に構築することができる。そのベクターは好ましくは、MAC内に含まれるDNAに対して相同性のDNAを有することで、DNAをMACに向かわせて、そこに組み込むようにする。そのベクターにはさらに、選択可能マーカー遺伝子および対象となる特定の異種遺伝子もある。本明細書の開示および当業者の知識に基づいて、当業者はそのようなベクターを構築することができる。

DNAを特定染色体の異質染色質領域に組み込むことができるベクター p T E M P U D とその誘導体が、ここでは特に興味深い。これらのベクターはまた、断片化ベクターとしても役立ち得る【例えば、実施例12参照】。

対象とする異種遺伝子には、治療効果のある物質をコードする遺伝子ならびに対象とする遺伝子生成物をコードするDNAなどがある。これらの遺伝子およびDNAには、嚢胞性繊維症遺伝子 [C F]、嚢胞性繊維症膜貫通調節蛋白質 (C F T R) 遺伝子などがあるが、これらに限定されるものではない（米国特許5 2 4 0 8 4 6 号 ; Rosenfeld *et al.* (1992) *Cell* 68:143-155 ; Hyde *et al.* (1993) *Nature* 362:250-255 ; Kerem *et*

al. (1989) *Science* 245:1073-1080 ; Riordan *et al.* (1988) *Science* 245:1066-1072 ; Rommens *et al.* (1989) *Science* 245:1059-1065 ; Osborne *et al.* (1991) *Am. J. Hum. Genetics* 48:6989-6122 ; White *et al.* (1990) *Nature* 344:665-667 ; Dean *et al.* (1990) *Cell* 61:863-870 ; Erlich *et al.* (1991) *Science* 252:1643 ; ならびに米国特許 5 4 5 3 3 5 7 号、5 4 4 9 6 0 4 号、5 4 3 4 0 8 6 号および 5 2 4 0 8 4 6 号（正常なC F T R 遺伝子をコードするレトロウイルスベクターを提供）など参照）。

B. 人工染色体の単離

本発明で提供されるMACは、当業者に公知の好適な方法によって単離するこ

とができる。さらに、本発明では、特にSATACのかかなりの精製を行う方法が提供される。SATACは、蛍光活性化細胞選択〔FACS〕によって単離されている。この方法は、高い異質染色質DNA含量により、細胞中の他の染色体とは異なるSATACのヌクレオチド塩基含有量を利用するものである。特定の実施態様では、中期染色体を単離し、ヘキスト（Hoechst）33258およびクロモマイシンA3などの塩基特異的染料で染色する。蛍光活性化細胞選択は、SATACを内因性染色体と分けるものである。2つのレーザー

が染料を別個に励起するよう設定されている二重レーザー細胞選択機〔FACS Vantage Becton Dickinson Immunocytometry Systems〕によって、塩基対の組成および大きさごとに染色体の二変量分析を行うことができた。そのようなSATACを含む細胞を同様に選別することができる。

内因性染色体から人工染色体を単離する本発明で提供される別の方法には、SATACなどの人工染色体の大量単離に特に好適な方法などがある。その方法では、SATACと内因性染色体との間の大きさおよび密度の差を利用して、それらの2種類の染色体を分離する。そのような方法には、スウィングバケット（swinging bucket）遠心、ゾーン遠心および速度沈降などの方法が関与する。内因性染色体から人工染色体を分離するための親和性、特に免疫親和性に基づく方法も、本発明で提供される。例えば、主として異質染色質であるSATACは、ハムスター細胞におけるように、内因性染色体が比較的少ない異質染色質を含む場合に、特異的に異質染色質および／またはそれに関連する蛋白を認識する抗体が関与する免疫親和性法によって、内因性染色体から分離することができる。

C. 人工染色体のin vitro構築

人工染色体は、細胞における安定な複製および分離を内因性染色体とともに行うことができる完全染色体に寄与する構造的および機能的要素を組み立てることで、in vitroで構築することができる。共同で機能性染色体を生じる別個の要素を確認することで、人工染色体のin vitro形成が可能となった。厳重に制御可能な人工染色体のin vitro構築のプロセスは、例えば大量に必要な染色体または遺

伝子導入動物系での特定用途に向けた染色体の形成において望まれる利点を提供
するものである。

例えば、in vitro構築は、時間および規模の効率が人工染色体製造において重
要な考慮事項である場合に有利であると考えられる。in vitro構築法には広範囲
の細胞培養法が関与しないことから、in vitroの細胞に基づく生産系で使用され
る細胞を形質転換、供給、培養および回収するのに必要な時間および労力が使え
ない場合に、それらを利用することができる。

in vitro構築は、所望の人工染色体のいくつかの要素を組み合わせる正確な方
法、ならびにそれらを組み立てて正確な規格の染色体を生成するのにどの配列お
よび割合とするかに関して、厳しく制御することができる。これらの側面は、特
定量の非常に純粋かつ特異的なDNA配列のみが宿主動物に導入されるよ

うにすることが望ましい生存動物で使用される人工染色体の製造において重要で
あると考えられる。

以下に、出発原料の例としてメガ染色体を利用して、in vitroで人工染色体の
構築に關与する方法について説明する。

1. 人工染色体の成分の確認および単離

本発明で提供されるMAC、特にSATACは、人工染色体のin vitro構築で
使用される成分の確認および単離で使用するのに好都合な簡単な染色体である。
本明細書に記載のように、非常に高レベルの純度までMACを精製する能力によ
り、これらの用途での使用が促進される。例えば、メガ染色体、特にはその切
断型〔すなわち、H1D3（受託番号96040929下にEuropean Collectio
n of Animal Cell Culture(ECACC)に寄託したもの；以下の実施例参照）由来の
IB3およびmM2C1等の細胞系〕は原料として役立つ。

例えば、mM2C1細胞系には、有利には1個のみの動原体、隣接するrDNA
A配列を有する組み込み異種DNAの2つの領域があり、染色体DNAの残りは
マウスの主要付随DNAであるミクロメガ染色体（約50～60kB）を有する
。他の切断メガ染色体は、末端小粒源として役立つ得るか、あるいは末端

小粒が提供できる（縦列の反復末端小粒配列を有するプラスミドの構築に関しては、下記の実施例参照）。mM2C1細胞系の動原体は、マウスの少量付随DNAを含み、それが動原体DNAの単離において有用な標識を提供する。

mM2C1細胞系のマイクロメガ染色体などの本発明で提供される特定SATACの別の特徴で、それらSATACを染色体成分の単離および確認における出発原料として役立つように特に適合させるものとしては、単一の特異的細胞系内の各メガ染色体の動原体が同一であるという事実である。均一な動原体源を用いて開始できることで（異なる動原体配列を有する異なった染色体の混合物とは対照的に）、動原体DNAのクローニングは非常に促進される。適切な制限エンドヌクレアーゼを用いての精製メガ染色体、特にマイクロメガ染色体などの切断メガ染色体を消化し、市販で公知のYACベクター（例えば、Burke *et al.*, (1987) *Science* 236:806-812参照）、BACベクター（例えば、Shizuya *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:8794-8797 (0.9~1 MbのDNAを組み込む能力を有する細菌人工染色体) 参照) またはPACベクター（300 kbのDNAを組み込む能力を有し、バクテリオファージパッケージン

グ (packaging) ではなくエレクトロポレーションによって大腸菌宿主細胞に導入されるP1人工染色体ベクター；例えば、Ioannou *et al.*, (1994) *Nature Genetics* 6:84-89; Pierce *et al.*, (1992) *Meth. Enzymol.* 216:549-574; Pierce *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:2056-2060; 米国特許5300431号および国際PCT出願WO92/14819号参照) に断片をクローニングすることで、わずか50個のクローンがマイクロメガ染色体全体を代表することができる。

a. 動原体

哺乳動物人工染色体の構築に使用される動原体の例には、例えばH1D3などの本発明で提供される含メガ染色体細胞系およびmM21C1細胞などのその誘導体のメガ染色体内に含まれるものがある。メガ染色体は、例えば本明細書に記載の手順を利用してそのような細胞系から単離され、動原体配列はその単離メガ染色体から抽出される。例えばメガ染色体は、例えば主として複製部位および

／または異種DNA組み込み部位および／または付随DNAにある部位で認識および切断する特定の制限エンドヌクレアーゼを利用して、断片に分離することができる。得られた断片の大きさに基づいて、含動原体配列から、

ある種の望ましくない要素を分離することができる。含動原体DNAは、1 Mb程度の大きさであると考えられる。

マウスの少量付随DNAに基づくプローブ [例えば、Wong et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:11645-11661参照] などの動原体配列を特異的に認識するプローブを用いて、メガ染色体由来の含動原体YAC、BACまたはPACクローンを単離することができる。別法にて、あるいは含動原体メガ染色体DNAの直接確認を併用して、マウスの主要付随DNA、異種DNAおよび／またはrDNAに特異的なプローブなどの非動原体要素を特異的に認識するプローブを用いて、含非動原体DNAクローンを確認・除去することができる。

さらに、本明細書に記載の動原体クローニング法を利用して、メガ染色体の含動原体配列を単離することができる。例えば実施例12には、動原体配列の確認のために、マウスチロシナーゼ遺伝子およびNMR1/Hanマウスとの併用でYACベクターを使用することが記載されている。

動原体断片を単離したら、その配列決定を行い、次にその配列データを、メガ染色体その他の動原体源からの動原体配列のPCR増幅に使用することができる。単離された動原体につ

いて、DNAを宿主哺乳動物細胞に転移させることで、in vivoでの機能を調べることができる。機能分析には例えば、動原体配列が動原体結合蛋白に結合する能力の検査などがあり得る。クローニングされた動原体は、選択可能マーカー遺伝子を有する哺乳動物細胞に転移され、抗動原体抗体などの動原体特異蛋白 (例えばLU851; Hadlaczky et al. (1986) Exp. Cell Res. 167:1-15参照) の結合を用いて、動原体の機能を評価することができる。

b. 末端小粒

好ましい末端小粒は、本発明で提供される1 kb合成末端小粒である (実施例

参照)。変わりなく反転配向のままである優性な選択可能マーカー遺伝子に連結した1 k B合成末端小粒を含む二重合成末端小粒構成物を用いて、操作しやすくなることができる。そのような二重構成物には、マーカー遺伝子の一連のTTAGGG反復3'と反転配列の一連の反復、すなわちGGGATTであるマーカー遺伝子の5'を、(GGGATT)_n---優性マーカー遺伝子---(TTAGGG)_nのように有する。適切に配向した断片のみを選択することから、反転マーカーの使用により、例えば平滑末端連結による等の簡単な挿入方法が提供される。

c. メガレプリケート

本発明で提供されるrDNAなどのメガレプリケート配列は、in vitro構築物での使用で好ましい。rDNAは複製源を提供し、in vitroでの人工染色体の増幅を促進して染色体を大きくし、例えば、対象とする異種遺伝子のコピーを多く有し、その異種遺伝子を連続的に高レベルで発現する配列も提供する。

d. 充填異質染色質

充填異質染色質、特に付随DNAを含有させて、人工染色体の構造的完全性および安定性を維持し、染色体内に遺伝子を有するための構造的基礎を提供する。付随DNAは、マウス主要付随DNAなどのA/T豊富DNA配列またはハムスター天然付随DNAなどのG/C豊富DNA配列であるのが普通である。そのようなDNA源には、十分なA/TもしくはG/C組成を有する非コード付随DNAを有して、FACSまたは密度勾配などによって、配列ごとの容易な分離を促進する真核生物などがある。付随DNAはさらに、非常にA/TもしくはG/C豊富なDNA単位の単調な縦列反復を含む配列を形成することで合成することもできる。

人工染色体の構築に使用される充填異質染色質の最も好適な

量は、例えば大きさを増しながら構築プロセスに各種長さの部分を含めることで、経験的に求めることができる。小さすぎて使用には適さない断片は、細胞に基づく発現試験で評価できる機能性染色体を提供しないか、あるいは機能の寿命または有糸分裂および構造の安定性が限られた染色体を生じる。

e. 選択可能マーカー

簡便な選択可能マーカーを、MACの簡便な座で用いることができる。

2. 単離染色体要素の組み合わせ

単離要素を得たら、それらを組み合わせ、完全で機能的な人工染色体を形成する。この組立は、例えば溶液、LMPアガロースまたはマイクロビーズでin vitro連結を行うことができる。連結を行って、動原体の一端が末端小粒に直接結合するようにする。遺伝子保有染色体腕として機能する動原体の他端は、付随DNAとrDNA配列の組み合わせから形成され、やはり選択可能マーカー遺伝子を有することができる。別の末端小粒は、遺伝子保有染色体腕の末端に結合させる。遺伝子保有腕とは、例えばそれによってコードされた所望の蛋白の発現で、対象の異種遺伝子が染色体のin vitro構築時またはその後のいずれかの時点で組み込まれる部位である。

3. 人工染色体の分析および試験

in vitroで構築された人工染色体は、SATAC、ミニ染色体について本明細書に記載の方法、または当業者に公知の方法のいずれかを用いて、in vivoの哺乳動物細胞系で機能性を調べることができる。

4. in vitro合成染色体への所望の異種DNAの導入

異種DNAは、分子生物学の常法を用いてin vitro合成染色体に導入することができ、SATACについて本明細書に記載の方法を用いて導入することができ、あるいは異質染色質などの合成要素の一つの一部として、in vitro合成染色体に組み込むことができる。異種DNAは、特定の反復断片に連結することができ、次に得られた構築物は、本発明で提供されるようなin vitro増幅法を用いてin vitroで増幅することができる（実施例参照）。

D. 細胞、組織、動物および植物への人工染色体の導入

本発明で提供されるMACの導入に好適な宿主には、動物もしくは植物、それらの細胞もしくは組織などがあるが、これらに限定されるものではなく、例としては、哺乳動物、鳥、は虫類、両生類、昆虫、魚、蜘蛛、タバコ、トマト、小麦、植物お

よびソウ類等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。細胞に含まれる場合、MACは細胞融合もしくは微小核体融合によって導入することができる。あるいはMACが細胞から単離されている場合、直接DNA転移、エレクトロポレーション、脂質介在転移（例：リポフェクションおよびリポソーム）、微小粒子衝撃法（microprojectile bombardment）、細胞および胚での微量注入、原形質体の植物への再生および他の好適な方法など（これらに限定されるものではない）を含む当業者には公知の方法によって、これらは宿主細胞に導入することができる [例えば、Weissbach *et al.* (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, N.Y., Section VIII, pp.421-463; Grierson *et al.*

(1988) *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9参照; さらに、米国特許 5 4 9 1 0 7 5 号、5 4 8 2 9 2 8 号および 5 4 2 4 4 0 9 号も参照; 哺乳動物の分離細胞の粒子介在形質転換について記載した米国特許 5 4 7 0 7 0 8 号も参照]。

細胞にDNAを導入する他の方法には、核微量注入および無傷の細胞との細菌原形質体融合などがある。ポリブレンおよびポリオルニチンなどの多価カチオンも用いることができる。哺

乳動物細胞の形質転換のための各種技術については、例えばケオウンらの報告 (Keown *et al.* *Methods in Enzymology* (1990) Vol. 185, pp. 527-537) およびマンソールらの報告 (Mansour *et al.* (1988) *Nature* 336:348-352) を参照する。

例えば、単離・精製された人工染色体を、ヒト腎臓初期胚細胞系 [ATCC 受託番号 CRL 1573] または胚幹細胞 [例えば、Hogan *et al.* (1994) *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 参照、特に 255-264 ページおよび添付資料 3 を参照] などの胎仔細胞系に注入することができる。

好ましくは、エッペンドルフ (Eppendorf) 自動微量注入システムなどのシステムを用いる微量注入によって染色体を導入し、ハイグロマイシン B またはネオマイシンの存在下等の選択条件下に成長させる。

1. 宿主への染色体の導入方法

使用する宿主細胞に応じて、そのような細胞に適した標準的方法を用いて形質転換を行う。その方法には、当業者には公知である以下に記載のものなどがある。

。 a. DNA取り込み

細胞壁を持たない哺乳動物細胞の場合、異種DNA導入のためのリン酸カルシウム沈殿法が好ましい場合が多い〔例えば、Graham *et al.* (1978) *Virology* 52:456-457; Wigler *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:1373-1376; および *Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1*, Wiley Inter-Science, Supplement 14, Unit 9.1.1-9.1.9(1990)参照〕。

DNA取り込みは、DNA単独または融合剤であるポリエチレングリコール存在下に〔PEG介在遺伝子転移〕、あるいは当業者に公知のそのような方法の変法〔例えば、米国特許4684611号参照〕によって行うことができる。

細胞へのDNA導入の好ましい方法には脂質介在キャリア系もある〔例えば、Teifel *et al.* (1995) *Biotechniques* 19:79-80; Albrecht *et al.* (1996) *Ann. Hematol.* 72:73-79; Holmen *et al.* (1995) *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31:347-351; Remy *et al.* (1994) *Bioconjug. Chem.* 5:647-654; Le Bolc'h *et al.* (1995) *Tetrahedron Lett.* 36:6681-6684; Loeffler *et al.* (1993) *Meth. Enzymol.* 217:599-618参照〕。

リポフェクション〔例えば、Strauss (1996) *Meth. Mol. Biol.* 54:307-327参照〕を用いて、DNAを細胞に導入することもできる。この方

法は特に、ニワトリ細胞への外来DNAの転移に好適である（例えば、ニワトリ胚葉細胞および主要なニワトリ線維芽細胞；Brazolot *et al.* (1991) *Mol. Reprod. Dev.* 30:304-312参照）。詳細には、対象とするDNAを、リソチームおよび卵白アルブミンなどの遺伝子からのプロモータと機能的連結でニワトリに導入し、それを卵で発現させることによって、卵で異種DNAを発現させることができる。

細胞へのDNAの直接転移に有用な別の方法には、粒子銃電気融合〔例えば、

米国特許4955378号、4923814号、4476004号、4906576号および4441972号参照] およびビリオン介在遺伝子転移などがある。

陸上植物における遺伝子転移に対して一般に用いられるアプローチには、精製DNAの原形質体への直接導入が関与する。植物細胞への直接遺伝子転移の3つの基本的方法には、1) ポリエチレングリコール [PEG] 介在DNA取り込み、2) エレクトロポレーション介在DNA取り込みおよび3) 微量注入などがある。さらに、超音波処理を行って、植物を形質転換させることができる [例えば、国際PCT出願公開WO91/00358号参照]。

b. エレクトロポレーション

エレクトロポレーションでは、原形質体と外来DNAとの混合物を含む溶液に高電圧の電気パルスを印加して、植物原形質体および他の細胞の膜に可逆的な穴を設ける段階が関与する。エレクトロポレーションは、強固な細胞壁障壁を有する植物などの原核生物その他の細胞に用いられる [例えば、米国特許4784737号、5501967号、5501662号、5019034号、5503999号参照；さらには、Fromm *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:5824-5828も参照]。

例えば、エレクトロポレーションは多くの場合、植物の形質転換に使用される [例えば、*Ag Biotechnology News* 7:3および17 (1990年9月/10月) 参照]。この方法では、植物原形質体に対して、やはり表現型マーカーを含む対象DNAの存在下にエレクトロポレーションを行う。高電界強度の電気衝撃波が生体膜を可逆的に浸透性とすることで、プラスミドの導入を行うことができるようになる。エレクトロポレーションされた植物原形質体は細胞壁を修復し、分裂し、植物カルスを形成する。形質転換植物細胞は、発現される表現型マーカーによ

って確認される。外来DNAは、例えば露出した直線、環状もしくは超らせんDNA、リポソームに包み込まれたDNA、スフェロプラスト中のDNA、他の植物原形質体中のDNA、塩と複合体形成したDNAおよび他の方法などのいずれ

かの形で、原形質体に加えることができる。

c. 微小核体

人工染色体を含む微小核体を製造し、次に特定の標的細胞と融合させることで、染色体を転移させることができる。そのような微小核体の製造および融合の方法は公知である〔実施例参照。さらには、米国特許5240840号、4806476号、5298429号、5396767号、Fournier (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:6349-6353; および Lambert *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:5907-59参照〕。人工染色体を含む微小核体を用いた微小核体融合は、DT40ニワトリB前駆細胞などのトリ細胞へのMAC導入の特により有用な方法である〔例えば、Dieken *et al.* (1996) *Nature Genet.* 12:174-182参照〕。

2. 宿主

最適な宿主には、異種DNAの導入および発現に有用である

ことが知られている宿主などがある。ここで特に興味深いものとしては、動物および植物の細胞および組織があり、それには昆虫の細胞および幼虫、植物および動物などがあり（これらに限定されるものではない）、特に遺伝子導入（人間以外）動物ならびに動物細胞がある。他の宿主には、哺乳動物、鳥（特にニワトリなどの家禽）、は虫類、両生類、昆虫、魚、蜘蛛、タバコ、トマト、小麦、単子葉植物、双子葉植物および藻類、ならびに異種DNAの導入が望ましいあらゆる宿主などがあるが、これらに限定されるものではない。そのような導入は、本発明で提供されるMACを用いて行うことができるか、あるいは必要に応じて、本発明で提供されるMACを用いて、生物固有の動原体および／または機能性染色体単位を確認し、次に得られた動原体もしくは染色体単位を人工染色体として用いるか、あるいは別法として、MACの製造に関して本明細書に例示の方法を行って生物固有の人工染色体を製造することで行うことができる。

a. 遺伝子導入（人間以外）動物生産のための胚へのDNAの導入および動物細胞へのDNAの導入

遺伝子導入（人間以外）動物は、微量注入によって、哺乳動

物接合体の卵核に外来遺伝子材料を導入することで得ることができる〔例えば、米国特許4873191号および5354674号参照；さらに、米国特許出願08/159084号に基づく国際PCT出願公開WO95/14769も参照〕。接合体は、哺乳動物へ発達することができる。胚または接合体を宿主の雌子宮中に移植し、発達させる。詳細なプロトコールおよび例を以下に説明する。

核転移 [Wilmut *et al.* (1997) *Nature* 385:810-813、国際PCT出願WO97/07669およびWO97/07668参照]。すなわちこの方法では、対象の遺伝子を含むSATACを、好適な方法によって、哺乳動物腺細胞のように、分化全能核を有する適切なドナー細胞に導入することができる。次に、細胞融合または微量注入などによって、第2減数分裂の中期で停止している不活性な卵母細胞、好ましくは、除核細胞に、G0期またはG1期である細胞の二倍体核を導入する。実際の除去などの好適な方法によるか、あるいは機能的に核を除去する紫外線などの手段による処理を行うことによって、除核を行うことができる。次に、正しい倍数性を維持しながら、好ましくは新たな核と細胞質とのある一定の接触期間後に（畜牛の場合、

約6～20時間）、卵母細胞を活性化し、胚を再構築し、宿主に導入する。例えば、ノコダゾール、コルヒチン、コセミド (cocemid) およびタキゾールなどの微小管阻害剤の存在下に、再生細胞をインキュベーションすることで、倍数性を維持し、それによってDNAを1回複製する。

遺伝子導入ニワトリは、発達段階Xの受容胚に同様の段階のニワトリ肝からの分散胚葉細胞を注射することで得ることができる〔例えば、Etches *et al.* (1993) *Poultry Sci.* 72:882-889;Petitte *et al.* (1990) *Development* 108:185-189参照〕。最初に、例えばリポフェクション〔例えば、Brazolot *et al.* (1991) *Mol. Repro. Dev.* 30:304-312参照〕または微小核体融合〔例えば、Dieken *et al.* (1996) *Nature Genet.* 12:174-182参照〕などの方法を用いて、ドナー胚葉細胞に、異種DNAを導入する。次に、トランスフェクションしたドナー細胞を、受容体であるニワトリ胚に注入する〔例えば、Carsience *et al.* (1993) *Development* 117:669-675参照〕。殻体内の受容体ニワトリ胚を明かりに透かして観察

し、孵化して、生殖細胞キメラニワトリを得るようにする。
直接取り込み、ポリエチレングリコール〔PEG〕とのイン

キューベーション、微量注入、エレクトロポレーション、リポフェクション、細胞融合、微小核体融合、微小粒子衝撃法などの粒子衝撃法〔例えば、粒子衝撃を介して、分離した哺乳動物細胞の形質転換を行う方法を提供する米国特許5470708号参照〕、他のそのような方法などの（これらに限定されないが）公知の方法を用いて、DNAを動物細胞に導入することができる。例えば、リボソーム中のプラスミドDNAのin situでのヒト細胞への直接転移が、ヒトでの使用についてFDAによって承認されている〔例えば、Nabel et al. (1990) *Science* 249:1285-1288および米国特許5461032号参照〕。

b. 異種DNAの植物への導入

遺伝子導入植物の製造または開発については、多くの方法が当業者には利用可能である。使用される方法は主として、植物の種類によって決まる。これらの方法には、PEG誘発DNA取り込み、原形質体融合、微量注入、エレクトロポレーションおよび微小粒子衝撃法などのDNAの直接転移などがあるが、これらに限定されるものではない〔例えば、そのような方法についての総説に関してはUchimiya et al. (1989) *J. of Biotech.* 12:1-20参照；さらに、米国特許5436392号および54

89520号ならびに多くの他の特許も参照〕。この場合、MACの導入に際しては、微量注入、原形質体融合および粒子銃衝撃が好ましい。

タバコ、米、トウモロコシ、ライ麦、大豆、*Brassica napus*、綿、レタス、ジャガイモおよびトマトなどの植物を用いて、遺伝子導入植物が得られている。タバコおよびツクバネアサガオなどの他の植物は、それらの方法を開発し、遺伝子を最初に導入および発現させる実験モデルとして役立つことが多かった。

DNA取り込みは、植物原形質体を用いて、DNA単独または融合剤であるPEGの存在下に行うことができるか、あるいは当業者に公知のそのような方法の変法によって行うことができる〔例えば、Schilperootらに対する米国特許46

84611号参照]。原形質体と外来DNAの混合物を含む溶液に対する高電圧電気衝撃波印加を行って、可逆的穴を形成するエレクトロポレーションを用いて、例えば外来遺伝子を米および*Brassica napus*に導入して奏功している。培養細胞および無傷の植物器官の細胞ならびに組織培養および微小粒子衝撃法〔粒子銃装置を用いて、DNAを含む高密度微小粒子を高速まで加速して、その粒子を植物の細胞壁および細胞膜を貫通させる〕

における胚葉体などの植物細胞へのDNAの微量注入も用いられている。DNAを導入することができ、形質転換細胞から再形成することができる全ての植物細胞を用いて、転移人工染色体を有する形質転換した植物全体を作ることができる。植物宿主にDNAを導入する特定のプロトコールおよび手段を、特定の植物または栽培品種に適合するよう適応または改善する必要がある場合がある。

c. 昆虫細胞

(a) 有用な蛋白をコードする遺伝子の増幅を人工染色体で行って、昆虫細胞での蛋白収量を高めることができる；(b) 蛋白の生理的機能に必要な可能性のある糖付加およびリン酸化などの必要な翻訳後修飾を、昆虫細胞が支持し；(c) 昆虫細胞が、哺乳動物ウィルスを支持せず、従ってそのような感染源による生成物の交差汚染の問題がなくなり；(d) その方法は、昆虫細胞系における栄養蛋白、工業用蛋白または医療用蛋白の製造のための従来の組換えバキュロウィルス系より優れており；(e) 昆虫細胞の成長に最適な温度が低いことから（28℃）、生産のエネルギーコストが低く；(f) 昆虫細胞に対する血清を含まない成長培地によって生産コストが低くなり；

(g) 人工染色体を含む細胞は、低温でいくらかでも保存でき、(h) 昆虫の幼虫は、受精昆虫卵の微量注入により栄養蛋白、医療用蛋白または工業用蛋白の生物工場となる等（これらに限定されるものではないが）の多くの理由により、昆虫は人工染色体の導入に有用な宿主である〔*Bombyx mori*の卵に異種DNAを微量注入する方法を提供するJoy *et al.* (1991) *Current Science* 66:145-150参照〕。

MACまたは昆虫固有の人工染色体[BUGAC]を用いて、遺伝子を昆虫に導入する。実施例に記載したように、MACは昆虫において機能して、それに含まれる異種DNAを発現させるように思われる。例えば、実施例に記載のように、lacZ遺伝子に融合したB. moriアクチン遺伝子プロモータを有するMACが、融合遺伝子を含むプラスミドによるEC3/7C5細胞のトランスフェクションによって得られている。その後、選別を生き残ったトランスフェクションEC3/7C5細胞とB. mori細胞を融合させることで、β-ガラクトシダーゼ発現が検出される含MAC昆虫-マウスハイブリッド細胞系を得ている。

昆虫宿主細胞には、Spodoptera frugiperda [青虫]、Aedes

asegypti [蚊]、Aedes albopictus [蚊]、Drosophila melanogaster [ミバエ]、Bombyx mori [蚕]、Manduca sexta [スズメガ幼虫] およびTrichoplusia ni [イラクサキンウワバ]などの宿主があるが、これらに限定されるものではない。培養での昆虫細胞の繁殖に向けた努力が行われている。そのような努力は行列表毛虫ヨトウガSpodoptera frugiperdaに集中している。イラクサキンウワバTrichoplusia niおよび蚕Bombyx moriなどの他の昆虫からも細胞系が開発されている。スズメガ幼虫Manduca sextaを用いて、類似の細胞系を得ることができることも提案されている。昆虫にDNAを導入するには、それを幼虫に導入し、増殖させ、次に血リンパ液を幼虫から回収して、それから蛋白を単離できるようにする。

昆虫細胞への人工染色体導入のための本発明における好ましい方法は微量注入である[例えば、Tamura et al. (1991) Bio Ind. 8:26-31; Nikolaev et al. (1989) Mol. Biol. (Moscow) 23:1177-87; および本明細書で例示・考察してある方法参照]。

E. 人工染色体の応用および使用

人工染色体は簡便かつ有用なベクターを提供し、場合によっては(例えば、非常に大きい異種遺伝子の場合)、宿主への異

種遺伝子の導入のための唯一のベクターである。実質的にあらゆる対象遺伝子が

、人工染色体を介しての宿主への導入を行いやすい。そのような遺伝子には、受容体、サイトカイン、酵素、プロテアーゼ、ホルモン、成長因子、抗体、腫瘍抑制遺伝子、治療物質および多重遺伝子経路をコードする遺伝子などがあるが、これらに限定されるものではない。

本発明で提供される人工遺伝子は、蛋白および遺伝子産生物の生産方法で、特にそのような産生物の生成における宿主細胞として昆虫を用いて、さらには人工染色体（特にMAC）が医療用および工業用の重要な化合物の生物製造を最適化するための高信頼性で安定な有効な手段を提供する細胞（例えば、哺乳動物細胞）生産系で用いられる。それらはさらに、遺伝子治療での使用、ならびに遺伝子導入植物および動物の生産を目的としたものでもある〔上記、以下および実施例で述べてある〕。

1. 遺伝子治療

治療遺伝子産生物または多重遺伝子経路の産生物をコードする核酸は、治療を目的として、ヒトなどの宿主動物に、あるいは動物への導入のために標的細胞系に導入することができる。そのような治療目的には、治療することまたは欠如もしくは欠

陥のある遺伝子産生物を提供して抗腫瘍剤などの薬剤を標的細胞もしくは動物に提供すること、ならびに病原体に対する抵抗性を提供するかもしくは感受性を低下させるか、または疾患もしくは障害の症状を緩和する遺伝子産生物を提供することなどがある。以下に、遺伝子および遺伝子産生物の例をいくつか示す。そのような例示は本発明を限定するものではない。

a. 抗HIVリボザイム

以下に例示のように、抗HIVリボザイムをコードするDNAを、真正染色質に基づくミニ染色体およびSATACなどのMACを用いて、細胞に導入し、そこで発現させることができる。これらのMACを用いて、リボザイムを発現する遺伝子導入マウスを作ることができる。従ってそれらMACは、そのようなリボザイムの活性を調べるためのモデルとして、あるいはリボザイム産生細胞系を作ることができるモデルとして役立つ。さらに、抗HIVリボザイムをヒト細胞中

にコードするMACの導入は、HIV感染の治療として役立つ。そのような系はさらに、疾患特異的リボザイムの使用が特定の疾患を治療もしくは緩和する上で有効であることを示すものである。

b. 腫瘍抑制遺伝子

腫瘍抑制遺伝子は、その野生型対立遺伝子において、異常な細胞増殖を抑制する蛋白を発現する遺伝子である。腫瘍抑制蛋白をコードする遺伝子に突然変異もしくは欠失が生じると、生じた突然変異蛋白または腫瘍抑制蛋白発現の完全な喪失のために、細胞増殖が正しく調節されなくなる場合がある。その結果、特に細胞調節機序に対してすでに損傷がある場合には、異常な細胞増殖が起こる場合がある。多くのかなり研究されているヒト腫瘍および腫瘍細胞系が、腫瘍抑制細胞の欠如または機能喪失を有することが明らかになっている。

腫瘍抑制遺伝子の例としては、網膜芽細胞腫遺伝子すなわちRB遺伝子、p53遺伝子、結腸癌において欠失している遺伝子〔すなわち、DCC遺伝子〕および神経線維腫症1型〔NF-1〕腫瘍抑制遺伝子などがあるが、これらに限定されるものではない〔例えば、米国特許5496731号、Weinberg et al. (1991) 254:1138-1146参照〕。腫瘍抑制遺伝子の機能喪失または失活は、かなりの数のヒト癌の発生および／または進行において中心的な役割を果たすと考えられる。

p53遺伝子

p53遺伝子の体細胞突然変異は、ヒト癌に関連する遺伝子

突然変異で最も高頻度のものであると言われている〔例えば、Weinberg et al. (1991) Science 254:1138-1146参照〕。正常もしくは野生型p53遺伝子は、損傷を受けた場合に細胞形質転換を指向する細胞増殖の陰性調節因子である。p53発現産物は核で認められ、そこでは他の遺伝子産物と同時にあるいは共動的に作用し得る。p53が欠失した腫瘍細胞系を野生型p53ベクターで治療することで、腫瘍形成性を低下させることに成功している〔Baker et al. (1990) Science 249:912-915参照〕。

p 5 3 遺伝子をコードするDNAおよびそのDNAを含むプラスミドは公知である [例えば、米国特許 5 2 6 0 1 9 1 号参照；さらに、Chen *et al.* (1990) *Science* 250:1576;Farrel *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:2879-2887も参照；その遺伝子を有するプラスミドはATCCから入手可能であり、その配列はGenBank Databaseにあり、受託番号X 5 4 1 5 6、X 6 0 0 2 0、M 1 4 6 9 5、M 1 6 4 9 4、K 0 3 1 9 9である]。

c. CFTR遺伝子

嚢胞性繊維症 [CF] は、気道、汗腺、膵臓その他の臓器の上皮組織に発症する常染色体劣性疾患である。それは、塩素イ

オン輸送における欠陥と関連する致死性遺伝病であり、各種真核細胞における塩素伝導性の発現と関連していた1480アミノ酸の蛋白である嚢胞性繊維症膜貫通伝導性調節蛋白質 [CFTR] をコードする遺伝子における突然変異が原因で生じる。CFTRにおける欠陥によって、気道、汗腺、膵臓その他の組織における上皮細胞が、cAMP介在作用薬に反応して塩素イオンを輸送する能力を破壊もしくは低下させ、cAMP依存性蛋白キナーゼA [PKA] による頂端膜チャネルの活性化を障害する。この疾患の発生率が高いことおよび破壊的性質を考慮すると、有効なCF治療の開発が急務である。

CFTR遺伝子 [約250kb] をMAC中にトランスフェクションし、それを例えば以下のように遺伝子治療に用いることができる。CF-YAC [Green *et al.* *Science* 250:94-98参照] を変性させて、プロマイシンもしくはハイグロマイシンに対する耐性を提供する蛋白をコードする遺伝子などの選択可能マーカー、およびneoミニ染色体もしくはSATACへの部位特異的組み込みで使用されるλ-DNAを持たせるようにすることができる。そのような変性CF-YACは、変性C

F-YACを有する酵母原形質体との融合あるいは変性CF-YACを有する酵母核の細胞への微量注入によって、EC3/7C5細胞もしくは19C5×Ha4細胞などの含MAC細胞に導入することができる。次に、抗生物質耐性に基

いて、安定な形質転換体を選択する。その形質転換体は、細胞に含まれるMAC中に変性CF-YACを有する。

2. 遺伝子的に変化を受けて、疾患に対する抵抗性などの望ましい形質を有する動物、鳥、魚および植物

人工染色体は、例えば、疾患抵抗性、苛酷な環境条件に対する抵抗性、異なった成長パターンおよび物理的特徴向上などのある種の所望の形質を有する鳥および魚ならびに哺乳動物のような脊椎動物および無脊椎動物を含む動物を得るのに、理想的に適している。

疾患抵抗性生物を得る上での人工染色体のある使用例には、多価ワクチンの製造が関与する。そのようなワクチンには、MACもしくは生物固有の人工染色体に含ませ、宿主に組み込んで免疫性を誘発するか、あるいは胚に組み込んで、ある種の疾患に対して免疫性であるかもしくは感受性が低い遺伝子導入（人間以外）動物および植物を形成することができる複数抗原

をコードする遺伝子などがある。

病原体を破壊もしくは弱毒化するあるいは病原体が宿主に接触するのを抑制する遺伝子産物（ある種の病原体に対して有毒であるリボザイムおよび蛋白など）をコードするDNAを有する人工染色体の宿主生物または胚に導入することで、疾患に対する抵抗性を与え、またはそれに対する感受性が低下した疾患抵抗性の動物および植物も得ることができる。

例えば、農業用および装飾用植物の産業などの分野における生物の有用性、加工可能性および商業的価値を高めると考えられる所望の形質を有する動物および植物も、疾患抵抗性の動物および植物の生産について上記と同様の方法で人工染色体を用いて得ることができる。そのような場合、生物または胚に導入される人工染色体は、生物において所望の形質を与える上で役立つ遺伝子産物をコードするDNAを有する。

特にニワトリなどの家禽のような鳥、魚および甲殻類は、人工染色体を用いた遺伝的に変化した生物の製造用のモデル宿主として役立つ。

3. ライブラリーの取得およびスクリーニングへのMACおよび他の人工染色体

の使用

大きいDNA断片を各人工染色体に組み込むことができるこ

とから、その染色体は、ゲノムDNAライブラリの取得において全ゲノムを有することができるクローニング媒体として用いるのに適しており、スクリーニングを容易に行うことができる。例えばMACを用いて、各種生物から機能性動原体DNAを確認および単離するのに有用なゲノムDNAライブラリを得ることができる。そのような利用分野では、特定生物からゲノムDNAライブラリを得るのに使用されるMACは、その生物の細胞中では機能性ではないものである。すなわちそのMACは、その生物の細胞におけるMAC内にある遺伝子を安定に複製せず、分離せず、その発現を行わない。好ましくはMACには、生物の細胞中の指標遺伝子の転写を促進することができるプロモーターに連結した指標遺伝子（例えば、 β -ガラクトシダーゼをコードするlacZ遺伝子またはネオマイシン、プロマイシン、ハイグロマイシンなどの抗生物質に対する耐性を与える産生物をコードする遺伝子など）を持たせる。生物からのゲノムDNAの断片をMACに組み込み、MACを生物からの細胞に転移させる。ゲノムDNA断片内に含まれる機能性動原体を組み込んだMACを有する細胞は、マーカー遺伝子発現を検出することで確認される。

4. 安定で高レベルの蛋白産生のためのMACおよび他の人工染色体の使用

本発明で提供されるMACおよび／または他の人工染色体は、蛋白の製造、特に生化学的経路もしくは多価ワクチンに関与する複数蛋白などの1つの細胞系からのいくつかの蛋白の製造に使用され、有効である。蛋白をコードする遺伝子を人工染色体に導入し、次にそれを細胞に導入する。別法として、対象の異種遺伝子を、その遺伝子が人工染色体に向かうような形で、すでに人工染色体を有する生産細胞系に転移させる。異種蛋白が発現される条件下で細胞を培養する。蛋白は安定で永久的なゲノム外染色体系において高レベルで発現されることから、選択的条件は必要ない。

細胞培養系での連続増殖に適応できる組換え宿主として役立ち得るトランスフ

ェクション可能な細胞〔例えば、McLean (1993) *Trends In Biotech.* 11:232-238〕は、人工染色体に基づく蛋白生産系での使用に好適である。宿主細胞系の例としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞〔例えば、Zang et al. (1995) *Biotechnology* 13:389-392参照〕、HEK 293、L tk⁻、COS-7、DG 44 および BHK 細胞な

どがあるが、これらに限定されるものではない。CHO 細胞は特に好ましい宿主細胞である。人工染色体に基づく蛋白生産系で使用する宿主細胞系の選択は当業界の技術範囲に含まれるものであるが、多くの場合、生産される異種蛋白の性質、宿主細胞における蛋白の毒性の可能性、蛋白の翻訳後修飾（例えば、糖化、アミノ化、リン酸化）の必要条件、細胞で利用できる転写因子、異種遺伝子の発現を推進するのに使用されるプロモーター要素の種類、産生が完全に細胞内であるかまたは異種蛋白が好ましくは細胞から分泌されるか、ならびに細胞における酵素処理の種類などの各種因子によって決まる。

異種蛋白生産のための人工染色体に基づく系は多くの有利な特徴を有する。例えば上述のように、異種 DNA は独立のゲノム外人工染色体（宿主細胞ゲノムの未知領域にランダムに挿入されたものや、一時的発現のみを与える染色体外要素として局在するものとは異なって）に局在することから、それは活性転写単位で安定に維持され、細胞分裂時の組み換えや脱離を介して放出されることはない。従って、宿主細胞に選択遺伝子を含める必要はなく、従って選択条件下での増殖も必要ない。さらに、人工染色体は DNA の大きい部分を組み込むことができる

ことから、染色体に複数の異種遺伝子および連結プロモーター要素のコピーを保持することができ、それによって外来蛋白を高レベルで発現させることができる。別法として、遺伝子の複数のコピーを 1 個のプロモーター要素に連結することができ、いくつかの異なる遺伝子を融合した多遺伝子複合体で単一のプロモーターに連結して、例えば完全な代謝経路を構成する全ての重要な蛋白を発現させることができる〔例えば、Beck von Bodman et al. (1995) *Biotechnology* 13:587-591 参照〕。別法として、単一遺伝子の複数のコピーを単一のプロモーターに機能的

に連結させることができるか、あるいは個々のまたは1個もしくは数個のコピーを異なるプロモータまたは同じプロモータの複数のコピーに連結させることができる。さらに、人工染色体は外来遺伝子の組み込みおよび発現に関してほとんど無限の能力を有することから、対象とする最終生成物をコードする遺伝子の発現だけでなく、宿主細胞の最適な維持および代謝管理に関連する遺伝子（例：成長因子をコードする遺伝子）ならびに所望の異種蛋白生成物の本来の構造における迅速な合成を容易にすることができる遺伝子（例：プロセッシング酵素および転写因子をコードする遺伝子）の発現にも使用可能である。MACSは、

生理活性にin vivoでの翻訳後修飾を必要とする蛋白およびペプチドなどのあらゆる蛋白もしくはペプチドの発現に好適である。そのような蛋白には、抗体断片、全長抗体および多重結合抗体、腫瘍抑制蛋白、天然もしくは人工の抗体および酵素、熱ショック蛋白その他などがあるが、これらに限定されるものではない。

そこで、そのような細胞に基づくMACを用いる「蛋白工場」を、適切なプロモーターを有する蛋白コード遺伝子、あるいは単一のプロモータによって作用する複数の遺伝子、すなわち融合遺伝子複合体〔植物発現系における完全代謝経路など；Beckvon Bodman (1995) Biotechnology 13:587-591参照〕の複数コピー〔理論的には、無限数または得られるMACが、ほぼゲノム染色体（すなわち内因性）の大きさ以下である数字以上〕で構成されるMACを用いて形成することができる。そのようなMACが構築されると、蛋白を含まない培地〔例えば、(1995) Biotechnology 13:389-39参照〕でのCHO細胞系、または連続生産を確定することができる他の不死化細胞系〔例えば、(1993) TIBTECH 11:232-238参照〕などの好適な細胞培養系に転移させることができる。

MACが宿主細胞において高レベルの異種蛋白発現を行う能力は、例えば、本明細書に記載されE C A C Cに寄託されたH 1 D 3およびG 3 D 5細胞系の分析によって示される。これらの細胞から得られるmRNAのノーザンブロッティング分析によって、細胞におけるハイグロマイシン抵抗性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が、それに含まれるメガ染色体のアンプリコン数と相関

していることが明らかである。

F. 反復DNA単位を含むDNA配列の合成方法

一般に、縦列反復DNAの組立により、相補的オリゴの明瞭なアニーリングなどの問題が生じる。例えば、別個にアニーリングされた生成物を、逆の配向で連結することができる。さらに、縦列もしくは反転した反復単位は、その配列を乱し得る組み換えおよび欠失事象を特に受けやすい。縦列反復DNA単位の配列合成のクローニング段階で使用する適切な宿主生物（例：rec株）の選択は、そのような事象の減少および排除に役立ち得るものである。

本発明においては、反復DNA単位を有する延長DNA配列の合成方法が提供される。その方法は特に、縦列に反復したDNA単位の配置の合成に適用できるが、通常そのような配列は、

他の公知の遺伝子組立戦略を用いて構築することは困難であるか、不可能である。これらの方法の具体的な用途は、単純な（例えば、2～6個のヌクレオチド）縦列反復（臨床的意義を持つ可能性のある末端小粒および付随DNA反復単位およびトリヌクレオチド反復単位など）ならびに複雑な反復DNA配列の合成におけるものである。これらの方法を用いた150を超える連続反復ヘキサマーを有する末端小粒配列の合成の特定の例を、本明細書に示してある。

縦列DNA反復配置の合成について本発明で提供される方法は、反復の配列を連続的に倍化することで、縦列反復の配置を級数的に延長する一連の延長段階に基づくものである。これらの方法は、遺伝子組立の既知の方法より勝る利点をいくつか提供するものである。例えば、原料のオリゴヌクレオチドは1回だけ使用する。本明細書に記載のDNA配置の最終生成物とともに、その構築における中間体は、微生物（例：大腸菌および酵母）におけるクローニング型で得ることができる。これらの方法に関して、特に重要な点としては、この方法ではわずか2つのオリゴヌクレオチドを必要とするだけであるにもかかわらず、この手順の各延長段階で、配列の長さは直線的にはな

く級数的に増加するという点である。制限部位は組立手順中にごく一時的に使用

されることから、その構築プロセスは、制限酵素認識配列および反復DNAの配列の適合性の影響を受けない。アダプターは必要ない。ただし、同様の機能を有する領域が、このプロセスで使用される2つの制限部位間にある。制限部位使用に関係する唯一の制限は、この方法で使用される2つの部位がいずれのクローニング段階でも使用されるベクターの他の箇所にあつてはならないという点である。その方法を利用して、ヒトアポリポ蛋白B100遺伝子(30bpの反復単位、100%AT)またはアルホイド付随DNAの各種数の縦列反復(VNTR)3'などの完全に同一の反復単位を有する複雑な反復を構築することができる。縦列反復を有するDNA配列の合成方法について、以下に説明する。

原料として２個のオリゴヌクレオチドを使用する。オリゴヌクレオチド１は、長さ k の反復配列のものであり（隣接部分とは無関係）、適切に選択された制限部位に隣接している比較的短い長さ（６０～９０ヌクレオチド）の反復単位を有する。

ここで、S1はE1〔好ましくは3'-突出(例:PacI, PstI, SphI, NsiIなど)または平滑末端を形成する酵素〕によって開裂する制限部位1であり; S2はE2(好ましくは、3'-突出を形成する酵素またはTspRIなどの認識部位外で開裂するもの)によって開裂する第2の制限部位であり; >は簡単な反復単位を表し、「_」は下記のオリゴヌクレオチド2に相補的な配列に隣接する短い(8~10)ヌクレオチドを示す。

ここで、S3は酵素E3についての第3の制限部位であり、構築時に使用されるベクターに存在する部位である。

4. 段階3—二本鎖DNAのベクターへの組み込み

二本鎖DNAを、制限酵素E1およびE3で開裂し、次に同じ酵素E1およびE3で開裂させてあったベクター（例pUC19または酵母ベクター）に連結させた。連結生成物を用いて、使用するベクターに適合する適正な宿主細胞を形質転換し（例：pUC19を用いる場合、大腸菌DH5αなどの細菌細胞が好適な宿主である）、次にそれを選択平板で平板培養する。組換え体は、色（例えば、β-ガラクトシダーゼ発現の場合はXgal染色によって）または³²P標識オリゴヌクレオチド2を用いるコロニーハイブリダイゼーション（オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによる検出が好ましい。その理

由としては、その配列はその後の各延長段階で除去され、反復配列の延長が奏功したDNAを含む組み換え体のみに存在するからである）によって確認することができる。

5. 段階4—プラスミドからの挿入物の単離

k個のヌクレオチドの反復配列を有する組換えプラスミドの少量サンプルを、制限酵素E1およびE3で消化させ、挿入物をゲルで単離する（挿入物が短い時はポリアクリルアミドであるが、その後の段階での比較的長い挿入物の単離ではアガロースを用いることができる）。組換えプラスミドの第2の少量サンプルを酵素E2（クレノウおよびdNTPで処理して、3'—突出を除去）およびE3で切断し、大きい断片（プラスミドDNAと挿入物）を単離する。

6. 段階5—k個反復のDNA配列の延長

2個のDNA（S1～S3挿入物断片とベクター+挿入物）を連結し、選択的平板で平板培養し、段階3のように延長組み換え体についてスクリーニングを行う。ここで、制限部位間の反復配列の長さは、前の段階における反復配列の2倍、すなわち2×kである。

7. 段階6—2×k個反復のDNA配列の延長

段階4および段階5を必要な回数繰り返して、所望の反復配列サイズを得る。各延長サイクルにおいて、反復配列の大きさは倍化する。すなわち、mを延長サ

イクル数とすると、反復配列の大きさは $k \times 2^m$ ヌクレオチドとなる。

以下に実施例を示すが、これらは例示のみを目的としたものであり、本発明を限定するものではない。

実施例 1

全般的な材料および方法

以下の材料および方法は、下記の実施例で使用され、人工染色体を含む細胞系を得るのに使用することができる方法の例である。当業者に公知である他の好適な材料および方法を使用することも可能である。当業者に公知のこれら材料および方法に対する変更も行うことができる。

A. 細胞系の培養、細胞融合および細胞のトランスフェクション

1. チャイニーズハムスターK-20細胞およびマウスA9線維芽細胞をF-12培地で培養した。EC3/7 [米国特許5288625号参照、受託番号90051001下にEuropean Collection of Animal Cell Culture (ECACC) に寄託；

さらに、Hadlaczky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8106-8110 および米国特許出願08/375271号も参照] およびEC3/7C5 [米国特許5288625号およびPraznovszky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:11042-11046参照] マウス細胞系ならびにKE1-2/4ハイブリッド細胞系を、 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ のG418を含むF-12培地 [SIGMA, St. Louis, MO] で維持した。

2. 以下に記載のTF1004G19およびTF1004G-19C5マウス細胞と以下に記載の19C5×Ha4ハイブリッドおよびその亜細胞系を、 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のハイグロマイシンB [Calbiochem] を含むF-12培地で培養した。LP11細胞を、 $3 \sim 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ のプロマイシン [SIGMA, St. Louis, MO] を含むF-12培地で維持した。

3. EC3/7C5細胞とプラスミド [ファルマシアから入手のpH132、pCH110; Hall et al. (1983) J. Mol. Appl. Gen. 2:101-109も参照] とλDNAとの共トランスフェクションを、受容体細胞 5×10^6 個当たりプラスミ

ドDNA 2~5 μ g およびスファージDNA 20 μ g を用いて、リン酸カルシウムDNA沈殿法 [例えば、Chen *et al.* (1987)

Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752参照] によって行った。

4. 細胞融合

マウスおよびハムスターの細胞を、ポリエチレングリコールを用いて融合した [Davidson *et al.* (1976) *Som. Cell. Genet.* 2:165-176]。400 μ g/mL のハイグロマイシンBを含むHAT培地中で、ハイブリッド細胞を選別した。

約 2×10^7 個の受容体細胞および 2×10^6 個のドナー細胞を、ポリエチレングリコールを用いて融合した [Davidson *et al.* (1976) *Som. Cell. Genet.* 2:165-176参照]。ハイブリッドを選別し、10% FCS および 400 μ g/mL G418を含むF-12/HAT培地で維持した [Szybalsky *et al.* (1962) *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 7: 75-89]。ハイブリッド細胞系における「親」染色体の存在が、ビオチン標識したヒトおよびハムスターのゲノムDNAならびにマウスの長い分散反復DNA [pMCPE1.51] を用いた、生物特異的プローブによるin situハイブリダイゼーションによって確認された。

5. 微小核体融合

EC3/7C5細胞から受容体細胞への人工染色体の微小核体介在転移を、グッドフェローら [Goodfellow *et al.* (1989)

Techniques for mammalian genome transfer, Genome Analysis a Practical Approach, K.E.Davies, ed., IRL Press, Oxford, Washington DC. pp. 1-17] およびヤマダら [Yamada *et al.* (1990) *Oncogene* 5:1141-1147] の変法を用い、サキソンらの方法に従って [Saxon *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 1:140-146] 行った。すなわち、T25フラスコ中の 5×10^6 個のEC3/7C5細胞を、最初に0.05 μ g/mLのコルセミドで48時間、次に10 μ g/mLのサイトカラシンBで30分間処理した。T25フラスコを端で遠心し、ペレット化した微小核体を血清を含まないDME培地中に懸濁させた。最初に5ミクロン、次に3ミクロンのポリカーボネートフィルターによって微小核体を篩い、50 μ

g/mLのフィトヘマグルチニンで処理し、受容体細胞とのポリエチレングリコール介在融合に用いた。MMCneoを含む細胞の選別を、400~800 µg/mLのG418を含む培地中で、融合から48時間後に開始した。

微小核体を、以下のようにして1B3およびGHB42ドナー細胞からも得て、E2D6K細胞と融合させた[プロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を有するCHO K-20細胞系、すなわち、SV40初期プロモーターの制御下

でのプロマイシン耐性遺伝子]。ドナー細胞を接種して、24~36時間以内に60~75%の集密度を得た。その後、12時間もしくは24時間にわたってコルヒチン(10 µg/mL)に曝露することで、細胞を有糸分裂で停止させ、微小核化を誘発した。GHB42細胞の微小核化を促進するため、細胞を低張処理した(37℃で10分間)。コルヒチン処理後、またはコルヒチンと低張処理後に、細胞をコルヒチンを含まない培地で成長させた。

ドナー細胞をトリプシン処理および遠心し、ペレットを1:1パーコール培地に懸濁させ、37℃で30~40分間インキュベーションした。インキュベーション後、 $1 \sim 3 \times 10^7$ 個の細胞(60~70%微小核化指数)を各パーコール勾配に負荷した(各融合を1~2勾配に分配した)。これらの勾配をSorvall SS-34ローター中34~37℃で80分間19000 rpmにて遠心した。遠心後、2つの細胞可視帯域を除去し、4℃で10分間2000 rpmにて遠心し、再懸濁させ、8 µm孔径ヌクレオポアフィルターで濾過した。

1B3およびGHB42細胞から得た微小核体を、E2D6Kと融合させた。E2D6K細胞は、pCHTV2によるCH

O K-20細胞のCapo₄トランスフェクションによって得られた。プラスミドpCHTV2は、SV40プロモーターおよびポリアデニル化信号、*Saccharomyces cerevisiae*URA3遺伝子、チャイニーズハムスター2番染色体特異的付随DNAの2.4および3.2 kb断片(HC-2付随体; Fatyol et al. (1994) *Nuc. Acids Res.* 22:3728-3736参照)、ジフテリア毒A鎖遺伝子の2個のコ

ピー（1個は単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ（HSV-TK）遺伝子プロモータおよびSV40ポリアデニル化信号に連結したものであり、他方はポリアデニル化信号を持たずにHSV-TKプロモータに連結したものである）、アンピシリン耐性遺伝子およびColE1複製開始点を有する。トランスフェクション後、ブロマイシン耐性コロニーを単離した。E2D6K細胞系におけるpCHTV2プラスミドの存在が、細胞から単離されたDNAの核酸増幅によって確認された。

精製微小核体を前述と同様にして遠心し、フィトヘマグルチニン-P（PHA-P、100 μ g/mL）2 mLに再懸濁した。次にその微小核体懸濁液をE2D6K細胞の60～70%集密度受容体培養物に加えた。それを室温で30～40分間イ

ンキュベーションして、微小核体を凝集させた。PHA-Pを除去した後、細胞を50%ポリエチレングリコール（PEG）1 mLとともに1分間インキュベーションした。PEGを除去し、培養物を血清を含まないF-12培地で3回洗浄した。細胞を非選択的培地中で48～60時間インキュベーションした。その後、細胞培養物をトリプシン処理し、400 μ g/mLのハイグロマイシンBおよび10 g/mLのブロマイシンを含むF-12培地で平板培養して、親細胞系に対して選別を行った。

ハイブリッド細胞を、選択培地で培養しておいた細胞から単離した。これらのクローンを次に、X-gal染色法によって β -ガラクトシダーゼの発現について分析した。GHB42微小核体とE2D6K細胞との融合によって得られていた5つのハイブリッドクローン中の4個が、染色結果が陽性で、GHB42細胞が与えたメガ染色体に含まれるlacZ遺伝子が β -ガラクトシダーゼを発現していることを示している。同様に、1B3微小核体とE2D6K細胞との融合によって形成していたハイブリッドクローンからは陽性の染色結果が得られ、1B3細胞が与えたメガ染色体に含まれるlacZ遺伝子が β -ガラクトシダーゼを発現していることを示唆していた。ハイブリ

ッドクロンのin situハイブリダイゼーションも行って、マウスーハムスターハイブリッド細胞のマウス染色体含有量も分析した。

B. 染色体分染

染色体のトリブシンG分染を、ワンらの方法(Wang & Fedoroff (1972) *Nature* 235:52-54) を用いて行い、BSGによる構成異質染色質の検出を行った。C分染法をサムナーの方法(Sumner (1972) *Exp. Cell Res.* 75:304-306) に従って実施した。プロモデオキシウリジン [BrdU] 組み込みによる染色体複製の検出には、ペリーらの(Perry & Wolff (1974) *Nature* 251:156-158) フルオレセインーギムザ [FPG] 染色法を用いた。

C. 染色体の免疫標識およびin situハイブリダイゼーション

ヒト抗動原体血清LU851 [Hadlaczky et al. (1986) *Exp. Cell Res.* 167:1-15] による間接免疫蛍光標識および同じ試料に対する間接免疫蛍光およびin situハイブリダイゼーションを、既報の方法に従って行った [Hadlaczky et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:8106-8110参照; さらに、米国特許出願08/375271号も参照]。マウスA9染色体の処理に関して2M塩酸を37℃で25分間行い、ハイブリッド細胞の

染色体に関して、1M塩酸を37℃で30分間用いた以外は、メーカー推奨の手順に従って、フルオレセイン標識抗BrdUモノクローナル抗体 [Boehringer] による免疫標識を行った。

D. 走査型電子顕微鏡検査

オスミウム含浸を用いた走査型電子顕微鏡検査のための有糸分裂染色体製造を、既報の方法に従って行った [Sumner (1991) *Chromosoma* 100:410-418]。その染色体を、加速電圧25kVで動作する日立S-800電界放出走査型電子顕微鏡で観察した。

E. DNA操作、プラスミドおよびプローブ

1. 一般的方法

DNA操作はいずれも、標準的方法によって行った [例えば、Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Labor

atory Press, Cold Spring Harbor, NY参照]。マウスの主要付随体プローブを、ラトナー博士の方法によって得た [Dr. J. B. Rattner, University of Calgary, Alberta, Canada]。カルガリー大学のラトナー博士から、マウスの主要付随体プローブなどのクローニングしたマウス付随DNAプローブ [Wong et al. (1988) Nucl. Acids Res.

16:11645-11661参照] の提供を受けた。完全ハムスターゲノムDNAを用いてハムスター染色体の着色を行い、2番染色体

の動原体領域に固有のクローニング反復配列 [Fátyol et al. (1994) Nucl. Acids Res. 22:3728-3736] も用いた。マウス染色体の着色を、マウス真正染色質に固有のクローニングした長い分散反復配列 [pMCP1. 51] を用いて行った。

共トランスフェクションおよびin situハイブリダイゼーションには、pCH110β-ガラクトシダーゼ構築物 [PharmaciaまたはInvitrogen] およびsc1875 Sam7ファージDNA [New England Biolabs] を用いた。

2. プラスミドpPuroTelの構築

プロマイシン耐性遺伝子およびクローン化2.5kbヒト末端小粒配列 [配列番号3] を、pBabe-puroレトロウイルスベクターから構築した [Morgenstern et al. (1990)

Nucl. Acids Res. 18: 3587-3596; Dr. L. Székely (Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institutet, Stockholm) によって提供; さらに、Tonghua et al. (1995) Chin. Med. J. (Beijing, Engl. Ed.) 108:653-659; Couto et al. (1994) Infect. Immun. 62:2375-2378; Dunckley et al. (1992)

FEBS Lett. 296:128-34; French et al. (1995) Anal. Biochem. 228:354-355; Liu et al. (1995) Blood 85:1095-1103; 国際PCT出願WO9520044号、WO9500178号およびWO9419456号も参照]。

F. 寄託細胞系

細胞系 KE1-2/4、EC3/7C5、TF1004G19C5、19C5×Ha4、G3D5 および H1D3 を、ブダペスト条約に従って、ECACC (European Collection of Animal Cell Culture) に、それぞれ受託番号 9604924、9604925、9604926、9604927、9604928 および 9604929 下に寄託した。これらの細胞系の寄託は 1996 年 4 月 9 日に行った (European Collection of Animal Cell Culture (ECACC) Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom)。寄託は、本願において寄託細胞系に対する正式の証明書を有し、欧州特許協定の規則 28 (1) (d) に従って、寄託細胞系を一般に利用可能とすることに対して無条件かつ最終的同意を与えたハドラツキー

(Gyula Hadlaczky, H.6723, SZEGED, SMAMOS U. I. A. IX. 36. HUNGARY) の名前で行った。

実施例 2

EC3/7、EC3/7C5 および関連細胞系の取得

EC3/7 細胞系は、neo-動原体を有する LMTK⁻マウス細胞系である。EC3/7C5 細胞系は、neo-ミニ染色体を有する EC3/7 の単一細胞サブクローンである。

A. EC3/7 細胞系

米国特許 5288625 号 [さらに、Praznovszky *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 11042-11046 および Hadlaczky *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 8106-8110 も参照] に記載の方法に従って、ヒトおよび細菌の DNA を有する λ 構築物 [λ CM8 および λ gtWESneo] の共組み込み後に、デノボ動原体形成を、形質転換マウス LMTK⁻線維芽細胞系 [EC3/7] で行う。

λ 中でクローニングした 14 kb のヒト DNA 断片 [λ CM8] および優性マーカー遺伝子 [λ gtWESneo] の共トランスフェクションにより、優性マーカー遺伝子 [neo-動原体] に連結した選択可能動原体を、マウス LMTK

C3/7で形成した [Hadlaczky et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:8106-8110; 図1参照]。異種DNA [λ DNAおよびマーカー遺伝子をコードするDNA] の組み込みを、末端動原体染色体 [7番染色体 (図1B参照)] の短腕に行い、そこで増幅プロセスを行うことで、新たな動原体が形成された [neo-動原体 (図1C参照)]。二動原体染色体 (図1C) については、新たに形成された動原体領域に、細胞および活性動原体に導入される全ての異種DNA [ヒト、λ および細菌] が含まれる。

同じ染色体に2つの機能的に活性な動原体があることで、動原体間で規則的切断が生じる [図1E参照]。二動原体染色体上の2個の動原体間の距離は約10~15 Mbと推定され、ミニ染色体を分離する切断が2つの動原体間で起こった。そのような固有染色体切断により、neo-動原体を有する染色体断片が生じる (細胞の約10%) (図1F)。この染色体断片は主として、ヒト、λ、プラスミドおよびネオマイシン耐性遺伝子DNAから構成されるが、若干のマウス染色体DNAも有する。細胞学的証拠から、MMC neoの安定化時にneo-動原体を有する染色体断片の反転複製があったことが示唆され

る。MMC neoを含む細胞系におけるミニ染色体の大きさは約20~30 Mbである。この所見は、大きさが倍化したことを示している。

二動原体染色体 [図1E] を有するEC3/7細胞系から、反復単一細胞クローニングによって、2個の亜細胞系 [EC3/7C5およびEC3/7C6] を選別した。これらの細胞系では、neo-動原体は専ら小さい染色体 [neo-ミニ染色体] 上に認められたが、元二動原体染色体は、検出可能な量の外来DNA配列を有しており、活性なneo-動原体は持たなかった [図1Fおよび1G]。

細胞系EC3/7C5およびEC3/7C6のミニ染色体は類似している。細胞レベルおよび分子レベルのいずれにおいても、それらの構成に相違は認められない。これらのミニ染色体は、従来の制限エンドヌクレアーゼマッピングやパル

スフィールド電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションを用いる広範囲マッピングによつては区別できなかった。EC3/7C6系の細胞の細胞骨格はコルヒチンに対する感受性が高いことを示していたことから、EC3/7C5系を用いてさらに詳細な分析を行った。

B. EC3/7C5およびEC3/7C6細胞系の取得

neo-ミニ染色体を有するEC3/7C5細胞を、高濃度のG418 [致死用量の40倍] でのEC3/7細胞系の350世代にわたるサブクロニングによつて得た。2つの単一細胞由来の安定な細胞系 [EC3/7C5およびEC3/7C6] を得た。これらの細胞系は、ミニ染色体上にneo-動原体を有し、二動原体染色体の残りの断片も有する。抗動原体抗体による間接免疫蛍光およびその後のin situハイブリダイゼーション実験から、ミニ染色体が二動原体染色体由来であることが示された。EC3/7C5およびEC3/7C6細胞系 (それぞれ、140個および128個の中期) において、無傷の二動原体染色体は認められず、それぞれ細胞の97.2%および98.1%でミニ染色体が検出された。これらのミニ染色体は、150細胞世代にわたって維持したものである。これらは、元二動原体染色体の残りの部分を有する。

末端小粒DNA配列の複数コピーを、in situハイブリダイゼーションによつて、元二動原体染色体の残りの部分のマーカー動原体領域で検出した。これは、マウス末端小粒配列が外来DNA配列によつて共増幅されたことを示している。これらの

安定なミニ染色体を有する細胞系は、別の動原体が機能して、ミニ染色体を維持することができることを示す直接の証拠を提供するものである [米国特許5288625号]。

neo-動原体をマウス染色体から分離するEC3/7細胞での染色体切断が、Gバンド陽性「外来」DNA領域で起こった。これは、元二動原体染色体の切断末端で入およびヒトDNA配列の痕跡が認められたことで裏付けられる。neo-動原体を有する染色体断片のGバンドパターンを安定なneo-ミニ染色体

のものと比較することで、neo-ミニ染色体が、neo-動原体を有する染色体断片の反転複製であることが明らかになっている。それはさらに、neo-ミニ染色体が1個の機能性動原体のみを有するが、ミニ染色体のいずれの末端も異質染色性であり、マウス付随DNA配列が、in situハイブリダイゼーションによってこれらの異質染色質領域で認められた。

そこで、これらの2つの細胞系EC3/7C5およびEC3/7C6は、優性マーカー遺伝子に連結した動原体を有する選択可能な哺乳動物ミニ染色体 [MMCneo] を有する [Hadlaczky *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:8106-8110]。MMCneoは、ミニ染色体介在遺伝子転移のベ

クターとして使用するためのものであり、ミニ染色体に基づくベクター系のモデルとして使用されてきた。

MMCneoの広範囲マッピング研究から、ヒトDNAおよびネオマイシン耐性遺伝子構築物が、マウス染色体に別個に組込まれ、次に外来DNAを含む染色体領域が増幅されることが明らかになっている。MMCneoは、約160kbの反復ブロックの形でλCM8およびλgtWESneoDNAの約30~50個のコピーを有し、それらが一緒になって、3.5Mb以上の領域を網羅している。これに加えて、マウス末端小粒配列 [Praznovsky *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:11042-11046] ならびに染色分体の正確で高次の構造構成に必要なマウス由来DNAがある。

専ら真正染色質マウスDNAを認識する染色体着色プローブmCPE1.51 [マウスの長い分散反復DNA] を用いたら、検出可能な量の分散反復配列が、in situハイブリダイゼーションによってMMCneoで認められた。neo-動原体は、少量であるが検出可能な量の付随DNAと関連している。neo-動原体をマウス染色体と分ける染色体切断が、「外来」DNA領域で起こる。これは、元二動原体染色体の切断末端に

およびヒトDNAが存在することで明らかである。しかしながら、MMCneoの両末端には、in situハイブリダイゼーションによって明らかなマウスの主要

付随DNAの痕跡がある。この所見は、MMCneoの安定化の際にneo-動原体を有する染色体断片の大きさが倍化するのは、反転複製の結果であることを示唆するものである。neo-動原体形成時に外来DNA配列で共増幅したマウス末端小粒配列は十分なMMCneo用末端小粒を提供できるが、複製によって、ミニ染色体用の機能性末端小粒が得られたものと考えられる。

neo-ミニ染色体の部分のヌクレオチド配列を次のようにして決定した。標準的方法に従って、EC3/7C5細胞から全長DNAを単離した。DNAについて、メーカーの手順に従って、PCRシステム(Expand Long Template PCR) [Boehringer Mannheim] を用いて核酸増幅を行った。その増幅方法では、neo-ミニ染色体に含まれるファージλ右腕の領域にある配列に相当する単一の33量体オリゴヌクレオチドプライマーのみが必要であった。このオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号13の最初の33個のヌクレオチドとして示してある。neo-ミニ染色体には、この配列の一連の反転反復があることから、

その単一のオリゴヌクレオチドを正および逆のプライマーとして用いて、ファージλDNAの反転反復集合間にあるDNAが増幅された。一つの増幅反応から3つの生成物が得られ、反転反復の異なる群の間にあるDNAの配列が異なっている可能性のあることが示唆された。人工染色体中の反復核酸単位において、わずかな相違がある可能性があり、人工染色体を有する細胞の培養時にそれが起こるものと考えられる。例えば、移動性遺伝要素の組み込みと反復配列の欠失とともに、塩基対変化が起こる可能性がある。

これら3つの生成物のそれぞれについて、DNA配列分析を行った。3つの生成物の配列はそれぞれ、配列番号13、14および15に示してある。配列決定した生成物がneo-ミニ染色体から増幅されたことを確認するため、ミニ染色体および元二動原体染色体を持たない陰性対照細胞系(マウスLtk⁻細胞)ならびにneo-ミニ染色体のみを有する陽性対照細胞系[19C5×Ha4細胞(図4参照)をBrdUで処理し、次にG418を含む選択培地で成長させ、BrdUで再処理する事で得られたマウス-ハムスターハイブリッド細胞系GB43]から単離したDNAについて、同じプライマーを用いて対照増

幅を行った。陽性対照細胞系のみが3つの増幅生成物を与え、陰性対照反応では、増幅生成物は検出されなかった。陽性対照増幅で得られた結果も、neoミニ染色体DNAが増幅され、元二動原体マウス染色体の断片は増幅されなかったことを示している。

3つの増幅生成物の配列を、Genbank/EMBLデータベースにある配列と比較した。配列番号13および14は、マウスからの槽内A粒子からのDNAの部分に対して高い(約96%)相同性を示していた。配列番号15は、データベースに入手できる配列とほとんど相同性を示さなかった。これら3つの配列を全て用いて、neoミニ染色体に対する相同性DNAとして遺伝子標的ベクターを得ることができる。

C. ミニ染色体の単離および部分精製

EC3/7C5細胞の有糸分裂染色体を、グリシン-ヘキシレングリコール緩衝液系 [Hadlaczky et al., (1982) *Chromosoma* 86: 643-659] を用いて、ハドラツキーら (Hadlaczky et al., (1981) *Chromosoma* 81:537-555] 記載の方法に従って単離した。染色体懸濁液を1200×gで30分間遠心した。ミニ染色体を含む上清を5000×gで30分間遠心し、ペレットを適切な緩衝液に再懸濁させた。部分的に精製したミニ染色体を-2

0℃で50%グリセリン中にて保存した。

D. MMCneo維持およびneo発現の安定性

284日にわたって非選択培地中で成長させ、次に400μg/mLのG418を含む選択培地に転移させたEC3/7C5細胞は、G418の存在下に永久的に培養された対照細胞と比較して、96%平板培養効率[コロニー形成]を示した。細胞形成分析では、選択および非選択培養条件下では、MMCneoが細胞当たり1個のコピーで安定に維持されることが示された。分析した2270個の分裂中期で、2個のMMCneoを有する分裂中期は2個のみ認められた。

サザンハイブリダイゼーション分析では、DNA制限パターンに検出可能な変化は示されず、選択または非選択培養条件下で成長させた細胞からのDNAを比較した場合、同様のハイブリダイゼーション強度がneoプローブで認められた

。選択および非選択条件下に成長させた細胞から単離したneo遺伝子からのRNA転写物のノーザン分析では、ごくわずかで重要性の低い相違のみが示された。neo遺伝子の発現は、非選択培養条件下で290日間G418を含まないF-12培地で維持されたEC3/7C5細胞で持続した。ミニ染色体か

らのneo遺伝子の長期発現は、MMCneoの核位置によって影響を受ける可能性がある。in situハイブリダイゼーション実験では、中間期核において、MMCneoの周辺位置が優先することが明らかになった。2500の核分析中60%を超えるもので、核外膜付近の核の周囲で、ミニ染色体が認められた。

実施例3

ミニ染色体転移とλneo染色体の製造

A. ミニ染色体転移

neo-ミニ染色体[MMCneoと称する、図2C]は、ハムスターおよびヒトなどの異なる哺乳動物細胞とミニ染色体を有する細胞[EC3/7C5またはEC3/7C6]との融合による遺伝子転移に使用されている。37個の安定なハイブリッド細胞系が得られている。得られたハイブリッド細胞系はいずれも、「染色体着色」用のビオチン化ヒトおよびハムスターのゲノムまたはpMCP E1.51マウス長分散反復DNAプローブを用いるin situハイブリダイゼーションによって明らかのように、真正のハイブリッドであることがわかっている。MMCneoはさらに、EC3/7C5細胞由来の微小核体の融合によってマウスA9、L929および多分化能F9テラト

カルシノーマに転移させて奏功している。転移は、PCR、サザンブロットニングおよびミニ染色体特異的プローブを用いたin situハイブリダイゼーションによって確認した。細胞形成分析から、微小核体融合について予想されるように、わずかな細胞[1~5%]がMMCneoを受けた（または保持した）ことが確認された。

これらの結果は、MMCneoが広範囲の細胞によって耐容されることを示し

ている。原核生物遺伝子およびミニ染色体上にあるヒトおよびλの配列についての過量投与は、組織培養細胞には不利ではないと考えられる。

MMCneoは、EC3/7C5ゲノムの最も小さい染色体であり、約20～30Mbと推定され、それは大半の宿主細胞（マウス）染色体よりかなり小さい。大きさが小さくなることで、簡単な分別遠心によって、単離染色体の懸濁液からミニ染色体を部分的に精製することができる。このようにして、純度15～20%のミニ染色体懸濁液が得られている。これらのミニ染色体豊富物を用いて、微量注入もしくはリポフェクションなどによって、ミニ染色体を特定の標的細胞に導入することができる。標的細胞には、遺伝子療法で使用できる治療細胞、さ

らには遺伝子導入（人間以外）動物を得るための胚細胞などがある。

MMCneoは、自己複製することができ、細胞中で安定に維持され、非選択条件下に長期培養した後であっても、neo遺伝子の持続的発現を可能とするものである。核外膜付近の領域を占有しているように思われるのは非組み込みベクターである。核においてそれが周辺部に局在していることは、MMCneoの機能的完全性および安定性を維持する上で重要な役割を有する。宿主核の機能的区画化は、外来配列の機能に効果を有すると考えられる。さらに、MMCneoはメガ塩基のλDNA配列を有し、それは相同的組換えと従って所望の遺伝子のMMCneoへの組み込みのための標的部位として役立つはずである。それは、細胞および微小核体の融合、微量注入、エレクトロポレーション、脂質介在キャリア系または染色体取り込みによって転移させることができる。MMCneoのneo-動原体は、比較的大きい150～200Mbのλneo染色体の正常な分離を維持および支持することができる。この結果は、MMCneo染色体が異種DNAの大きい断片を持つのに有用であるに違いないことを示している。

B. λneo染色体の製造

EC3/7およびチャイニーズハムスター卵巣細胞〔図2〕によって得られたハイブリッド細胞系KE1-2/4では、二動原体染色体からのneo-動原体の分離は、さらなる増幅プロセスと関連していた。この増幅によって、平均的な

大きさの安定な染色体が形成された〔すなわち、 λ neo 染色体；Praznovszky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:11042-11046 参照〕。 λ neo 染色体は、末端に位置する機能性動原体を有し、 λ 、ヒト、細菌およびマウスの DNA 配列の複数コピーを有する 7 個の大きいアンプリコンから構成されている〔図 2 参照〕。これらのアンプリコンは、アンプリコン間の構成異質染色質の狭いバンドを形成するマウスの主要な付随 DNA [Praznovszky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:11042-11046] によって分離される。

実施例 4

「ソーセージ染色体」(SC) の形成

上記の実施例に記載の所見は、マウス 7 番染色体の動原体領域が大量増幅能力を有することを示している〔他の結果は、この能力が 7 番染色体に固有のものではないことを示している〕。

この結論は、元二動原体 7 番染色体と neo-ミニ染色体を有する EC 3/7 C 5 に第 2 の優性選択可能マーカー遺伝子および非選択マーカー遺伝子を導入した共トランスフェクション実験からの結果によってさらに裏付けられる。EC 3/7 C 5 細胞系を、 λ ファージ DNA、ハイグロマイシン耐性遺伝子構築物 [pH 132] および β -ガラクトシダーゼ遺伝子構築物 [pCH110] で形質転換した。安定な形質転換体を、高濃度 [400 μ g/mL] ハイグロマイシン B の存在下に選別し、サザンハイブリダイゼーションによって分析した。取り込まれた外来 DNA の複数コピーを示す得られた形質転換細胞系について、in situ ハイブリダイゼーションによって調べて、取り込み部位の位置を決定し、LacZ 染色によって β -ガラクトシダーゼ発現を検出した。

A. 材料および方法

1. pH 132 の構築

pH 132 プラスミドは、 β -アクチンプロモーターの制御下に、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子および抗 HIV-1 gag リボザイム [リボザイムの配列に相当する DNA 配列については配列番号 6 参照] を有する。このプラスミドは、pHyg

プラスミド [Sugden *et al.*, (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:410-413; リッグ博士 (Dr. A. D. Riggs, Beckman Research Institute, Duarte) から提供; 例えば米国特許 4 9 9 7 7 6 4 号参照] および pPC-RAG 1 2 プラスミド [Chang *et al.*, (1990) *Clin. Biotech.* 2:23-31; ロッシ博士 (Dr. J. J. Rossi, Beckman Research Institute, Duarte) から提供; 抗 HIV g a g リボザイムならびに β -アクチンプロモーターと SV 4 0 後期遺伝子転写終止およびポリ A の信号に連結したリボザイム挿入物を有する哺乳動物発現ベクターの構築について記載している米国特許 5 2 7 2 2 6 2 号、5 1 4 9 7 9 6 号および 5 1 4 4 0 1 9 号も参照] から構築した。B a m H I リンカーが隣接しているリボザイム挿入物の挿入が関与する pPC-RAG 1 2 の構築を、B a m H I 消化 pH β -A p r - l g p t に行った [Gunning *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:4831-4835 参照、米国特許 5 1 4 4 0 1 9 号も参照]。

プラスミド p H 1 3 2 を以下のようにして構築した。最初に、pPC-RAG 1 2 [Chang *et al.*, (1990) *Clin. Biotech.* 2:23-31 に記載] を B a m H I で消化させて、遺伝子の 5' 末端にヒト β -アクチンプロモーターが隣接し、遺伝子の 3' 末端

に SV 4 0 後期転写終止信号およびポリアデニル化信号が隣接している抗 HIV リボザイム遺伝子 [リボザイム D と称する (Chang *et al.*, (1990) *Clin. Biotech.* 2:23-31 による); ロッシ (Rossi) らに対する米国特許 5 1 4 4 0 1 9 号、特にその特許の図 4 も参照] を有する断片を切り取った。チャンら (Chang *et al.*, (1990) *Clin. Biotech.* 2:23-31) の報告に記載のように、リボザイム D を標的として、H I V g a g 遺伝子の翻訳開始領域の開裂を行う。この pPC-RAG 1 2 の断片を p B l u e s c r i p t - K S (+) [Stratagene, La Jolla, CA] にサブクローニングして、プラスミド 1 3 2 を得た。次に、プラスミド 1 3 2 を X h o I および E c o R I で消化させて、遺伝子の 5' 末端に β -アクチンプロモーターが隣接し、遺伝子の 3' 末端に SV 4 0 終止信号およびポリアデニル化信号が隣接しているリボザイム D 遺伝子を有する断片を得た。この断片を、p H y g [Sugden *et al.*, (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:410-413] の E c o R I お

よび S a l I による消化によって得られた最大断片に連結して、p H 1 3 2 を得た。そこで、p H 1 3 2 は、抗 H 1 V リボザイム遺伝子と次に S V 4 0 終止信号およびポリアデニル化信号に連結した β -アクトチンプロモーター、

ハイグロマイシン耐性遺伝子と次にチミジンキナーゼ遺伝子ポリアデニル化信号に連結したチミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、ならびに大腸菌 C o l E 1 複製開始点およびアンピリシン耐性遺伝子という要素を有する約 9. 3 k b のプラスミドである。

H S V-1 t k 遺伝子からの転写対照を用いてハイグロマイシン B に対する耐性を与えるプラスミド p H y g [例えば、米国特許 4 9 7 7 6 4 号、4 6 8 6 1 8 6 号および 5 1 6 2 2 1 5 号参照] は最初は、p K a n 2 [Yates *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3806-3810] および p L G 8 9 [Gritz *et al.*, (1983) *Gene* 24:179-188参照] から構築されたものである。すなわち、p K a n 2 を S m a I および B g l I I で消化させて、トランスポゾン T n 5 由来の配列を取り出した。S n a I 部位での平滑末端連結および B g l I I 部位での「突出末端」連結 [容量 2 0 m L 中、T 4 D N A リガーゼ (B R L) 1 ユース単位を使用] を用いて、ハイグロマイシン耐性 h p h 遺伝子を消化した p K a n 2 に挿入した。p K a n 2 の S m a I 部位および B g l I I 部位は連結時に失われた。

p H y g へのプロモーターおよびポリ A 部位を有する抗 H 1

V リボザイム構築物の導入から得られるプラスミド p H 1 3 2 には、 β -アクトチンプロモーターの制御下での抗 H 1 V リボザイムならびに T K プロモーターの制御下でのハイグロマイシン耐性遺伝子がある。

2. 染色体分染法

染色体のトリプシン G 分染を、実施例 1 に記載の方法に従って実施した。

3. 細胞培養

以下に記載の T F 1 0 0 4 G 1 9 および T F 1 0 0 4 G-1 9 C 5 マウス細胞と 1 9 C 5 \times H a 4 ハイブリッドならびにその亜細胞系を、4 0 0 μ g / m L

のハイグロマイシンB [Calbiochem] を含むF-12培地で培養した。

B. EC3/7C5の共トランスフェクションによるTF1004G19の生成

プラスミド [ファルマシアから入手可能なpH132、pCH110; Hall et al. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2:101-109も参照] およびλDNA [λc1875 Sam7 (New England Biolabs) とEC3/7C5との共トランスフェクションを、 5×10^6 個の受容体細胞当たりプラスミドDNA 2~5 μgお

よびλファージDNA 20 μgを用いて、リン酸カルシウムDNA沈殿法 [例えば、Chen et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752参照] によって行った。

C. ソーセージ染色体を有する細胞系

TF1004G19と称される形質転換体の一つの分析から、それがかなりのコピー数の組み込みpH132配列およびpCH110配列を有し、高レベルのβ-ガラクトシダーゼ発現を有していることが明らかになった。G分染およびヒトプローブ [CM8; 例えば、米国特許出願08/375271号参照] を用いたin situハイブリダイゼーションによって予想外に、EC3/7C5細胞系の元二動原体7番染色体で組み込みが起こったことが明らかになった。さらにこの染色体は、新たに形成された異質染色質染色体腕を有していた。この異質染色質腕の大きさは、個々の分裂中期で約150~約800Mbの範囲であった。

TF1004G19細胞系からの単一細胞クローニングによって、約100~150Mbの異質染色質腕を有する安定な7番染色体 [ソーセージ染色体] を持つサブクローンTF1004G-19C5 [図2D] を得た。この細胞系は、受託番号9

6040926下にECACCに寄託してある。この染色体腕は、付随DNA豊富な4~5個の付随部分と、等間隔に組み込まれた異種「外来」DNA配列から構成されている。ソーセージ染色体のコンパクトな異質染色質腕の末端には、凝縮度の比較的小さい真核末端部分が規則的に認められる。このサブクローンを用いて、さらに分析を行った。

D. ソーセージ染色体が元二動原体染色体由来であることの明示

TF1004G-19C5細胞系におけるλファージおよびpH132DNAによるin situハイブリダイゼーションにより、ミニ染色体上ならびに「ソーセージ」染色体の異質染色質腕のみでの陽性のハイブリダイゼーションが明らかになった〔図2D〕。「ソーセージ」染色体〔以下、SCとも称する〕がEC3/7C5細胞系の元二動原体染色体（FD）から形成されたように思われる。

これを確認するため、pCH110およびpH132プラスミドの組み込み部位を決定した。これは、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のピオチン標識小断片によるこれら細胞でのin situハイブリダイゼーションによって行った。両方の実験により、ソーセージ染色体の異質染

色質腕での狭いハイブリダイゼーションバンドが生じた。同じハイブリダイゼーションパターンが、ピオチン標識λプローブおよびpH132プラスミドの混合物を用いて、ソーセージ染色体で検出されて、λファージ、pH132プラスミドおよびpCH110プラスミドの共組み込みが明らかになった。

これをさらに調べるため、DNA結合染料ヘキスト33258の存在下に細胞を培養した。この染料存在下でのマウス細胞の培養により、中期染色体の挟動原体異質染色質の低凝縮が生じ、ハイブリダイゼーションパターンを比較的良好に観察することができる。この方法を用いると、TF1004G-19C5細胞のソーセージ染色体の異質染色質腕は規則的な低凝縮を示し、in situでのハイブリダイゼーションによる「ソーセージ」染色体の構造が詳細にわかる。ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のピオチン標識小断片を有するヘキスト処理TF1004G-19C5細胞でのin situでのハイブリダイゼーションの結果は、これらの遺伝子がソーセージ染色体の異質染色質腕のみに局在することを示している。さらに、等しい分染ハイブリダイゼーションパターンが認められた。この反復単位〔アンプリコン〕パターンは明瞭に、増幅プ

ロセスによってソーセージ染色体が形成されたこと、ならびにλファージ、pH132およびpCH110プラスミドDNA配列がアンプリコンに隣接していることを示している。

マウス挟動原体異質染色質の主要構成成分であるマウスの主要付随DNAを用いて実施された蛍光in situハイブリダイゼーション [FISH] を用いた別の系統の実験では、結果から、ソーセージ染色体のアンプリコンが主として付随DNAから構成されることが確認された。

E. ソーセージ染色体の1個の動原体

マウス動原体配列が「ソーセージ」染色体を形成する増幅プロセスに関与していたか否かならびにアンプリコンが不活性動原体を有するか否かを決定するため、マウスの少量付随DNAを用いてin situハイブリダイゼーションを行った。マウスの少量付随DNAは特に、全てのマウス染色体の動原体付近に局在している。ソーセージ染色体を含む全ての動原体で陽性のハイブリダイゼーションが検出されたが、それは異質染色質腕の開始時に陽性の信号を示すのみであった。

機能性動原体 [例えば, Hadlaczky *et al.* (1989) *Chromosoma* 97:282-288 参照] のみを認識するヒト抗動原体抗体 [LU

851] を用いた間接免疫蛍光では、ソーセージ染色体が活性動原体を1個のみ有することが明らかになった。動原体は、染色体の元二動原体部分から来るもので、マウスの少量DNAプローブのin situハイブリダイゼーション信号とともに局在している。

F. ソーセージ染色体の異質染色質における選択および非選択異種DNAの発現

1. 高レベル異種遺伝子の発現

そうしてTF1004G-19C5細胞系は、ソーセージ染色体の異質染色質腕にのみ局在するハイグロマイシン耐性遺伝子および β -ガラクトシダーゼ遺伝子の複数コピーを有する。TF1004G-19C5細胞は、200 μ g/mLのハイグロマイシンBの存在下で、あるいは400 μ g/mLの場合でさえ、非常に良好に成長することができる [発現レベルは、ハイグロマイシン耐性遺伝子および単一コピー遺伝子の小断片によるノーザンハイブリダイゼーションによって求めた。]。

TF1004G-19C5形質転換体における非選択 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を、細胞のLacZ染色によって検出した。この方法により、100

%の細胞が暗青色に染色さ

れ、全てのTF1004G-19C5細胞において高レベルの β -ガラクトシダーゼ発現があることを示している。

2. 発現される異種遺伝子のソーセージ染色体の異質染色質での存在

ソーセージ染色体の構成異質染色質に局在する遺伝子が、TF1004G-19C5形質転換体〔すなわち、 β -gal発現〕のハイグロマイシン耐性およびLacZ染色能力を提供することを示すため、TF1004G-19C5マウス細胞とチャイニーズハムスター卵巣細胞との間のPEG誘発細胞融合を行った。ハイブリッドを選別し、G418〔400 μ g/mL〕およびハイグロマイシン〔200 μ g/mL〕を含むHAT培地で維持した。19C5 \times Ha3および19C5 \times Ha4と称される2個のハイブリッドクローン（これらは受託番号96040927下にECACCに寄託してある）を選別した。そのいずれも、ソーセージ染色体とミニ染色体を有している。

19C5 \times Ha4ハイブリッドの単一細胞由来コロニー27個を維持し、個々のサブクローンについて分析した。ハムスターおよびマウスの染色体着色プローブおよびハムスター2番染色体特異的プローブを用いたin situハイブリダイゼーション

により、19C5 \times Ha4クローンが完全チャイニーズハムスターゲノムおよび部分的マウスゲノムを有することが確認された。19C5 \times Ha4サブクローンはいずれも、ハムスターゲノムを保持したが、異なるサブクローンは、異なる数のマウス染色体を示し、マウス染色体の優先的脱離を示している。

マウス染色体のさらなる脱離を促進するため、ハイブリッド細胞をBrdUで繰り返し処理した。ゲノムを不安定化させるBrdU処理によって、マウス染色体が大幅に失われる。BrdU処理19C5 \times Ha4ハイブリッド細胞を3つの群に分けた。一つのハイブリッド細胞群（GH）を、ハイグロマイシン（200 μ g/mL）およびG418（400 μ g/mL）の存在下に維持し、他の2つの細胞群は、G418（G）もしくはハイグロマイシン（H）選択条件下で培養

して、ソーセージ染色体もしくはミニ染色体の脱離を促進させた。

1ヶ月後、単一細胞由来サブクローンを、19C5×Ha4ハイブリッド系のこれら3個の継代培養物から得た。ビオチン標識入ファージおよびハムスター染色体着色プローブによるin situハイブリダイゼーションによってサブクローンをモニタリングした。ソーセージ染色体を失っていたかミニ染色体を保

持したG418の存在下に選別された4つの個々のクローン〔G2B5、G3C5、G4D6、G2B4〕が認められた。ハイグロマイシン選別下では、1個のサブクローン〔H1D3〕のみがミニ染色体を失った。このクローンには、メガ染色体〔実施例5参照〕が存在していた。

ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子はソーセージ染色体から発現されると考えられたことから、これら遺伝子の発現を、ソーセージ染色体を失っている4つのサブクローンで分析した。200μg/mLハイグロマイシンの存在下に、4つの個々のサブクローンの細胞の100%が死んだ。β-ガラクトシダーゼ発現ハイブリッドを検出するため、LacZ染色によってサブクローンを分析した。ソーセージ染色体を失った4つのサブクローンの細胞の100%が、LacZ染色能力も失った。非選択培養条件下でソーセージ染色体を失わなかった他のいずれのハイブリッドサブクローンも、LacZ染色は陽性であった。

これらの所見は、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現がソーセージ染色体の存在に関連していることを示すものである。in situハイブリダイゼーシ

ョンの結果は、異種DNAがソーセージ染色体の構成異質染色質から発現されることを示している。

他の3つのハイブリッドサブクローン〔G2C6、G2D1およびG4D5〕のin situハイブリダイゼーション研究では、ソーセージ染色体の存在は検出されなかった。LacZ染色法によって、これらハイブリッド系で染色した細胞が一部検出され、これらのサブクローンについてハイグロマイシン選別を行ったと

ころ、一部のクローンが生残した。これらハイグロマイシン耐性コロニーの細胞学的分析およびin situハイブリダイゼーションからソーセージ染色体の存在が明らかになり、ソーセージ染色体を失っていないG 2 C 6、G 2 D 1およびG 4 D 5ハイブリッドの細胞のみがハイグロマイシン耐性およびβ-ガラクトシダーゼ発現を保持できたことが示唆された。この結果は、これら遺伝子がソーセージ染色体の存在に関連していることを確認するものであった。β-ガラクトシダーゼ発現のレベルを、モノクローナル抗体を用いる免疫プロットング法によって測定した。

ソーセージ染色体を有する細胞のハイグロマイシン耐性およびβ-ガラクトシダーゼが、マウス挟動原体異質染色質に局在

する遺伝子によって発現された。これは、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のPCR増幅小断片をプローブとして用いて、ソーセージ染色体を持たないハイブリッド細胞でサザンDNAハイブリダイゼーションを行うことで示された。いずれのサブクローンも、これらプローブとのハイブリダイゼーションを示さなかった。しかしながら、分析したクローンのいずれにもミニ染色体があった。ソーセージ染色体を有する他のハイブリッドクローンは、これらDNAプローブとの強力なハイブリダイゼーションを示した。これらの結果から、ソーセージ染色体を有する細胞のハイグロマイシン耐性およびβ-ガラクトシダーゼ発現がマウス挟動原体異質染色質に局在する遺伝子によって行われたとすることができる。

実施例 5

ギガ染色体

実施例 4 で説明した通りに、ソーセージ染色体を細胞融合によってチャイニーズハムスター細胞に転移させた。ハイグロマイシンB/HATおよびG 4 1 8 選別を用いて、ソーセージ染色体を有する2つのハイブリッドクローン1 9 C 5 × H a 3 および1 9 C 5 × H a 4 を得た。ハムスターおよびマウス染色体

着色プローブおよびハムスター2番染色体特異的のプローブを用いたin situハイ

ブリダイゼーションにより、19C5×Ha4が完全なチャイニーズハムスターゲノムと一部のマウスゲノムを有することが確認された。27個の19C5×Ha4コロニーを維持し、個々のサブクローンとして分析した。27個のサブクローン中26個が形態的に未変化のソーセージ染色体を有していた。

19C5×Ha3細胞系の1個のサブクローン、19C5×Ha47〔図2E参照〕では、ソーセージ染色体の異質染色質腕が不安定となり、継続的な染色体内成長を示した。極端な場合、増幅染色体腕の大きさは1000Mbを超えていた（ギガ染色体）。

実施例6

安定なメガ染色体

A. メガ染色体を有する細胞系の形成

すべての19C5×Ha4サブクローンは完全なハムスターゲノムを保持したが、異なるサブクローンは異なった数のマウス染色体を示したことから、マウス染色体の優先的脱離が示された。実施例4に記載のように、マウス染色体のさらなる脱離

を促進するためには、ハイブリッド細胞をBrdUで処理し、G418（G）もしくはハイグロマイシン（H）選択条件下に培養し、次に 10^{-4} MのBrdUで16時間の再処理を行い、単一細胞サブクローンを得た。BrdU処理がゲノムを不安定化させて、同様にソーセージ染色体における変化を引き起こしたように思われた。さらに増幅を行った細胞群で、徐々に増加するのが認められた。ソーセージ染色体の約150～250Mb異質染色質染色体腕が形成され、それはマウス7番染色体のものとは異なっていた。別の真正染色質終端部分を獲得することで、新たな次中部動原体染色体（メガ染色体）が形成された。79個の個々のサブクローンを、単一細胞クローニングによって、これらのBrdU処理培地から得た。42個のサブクローンが無傷のメガ染色体を有し、5個のサブクローンがソーセージ染色体を有し、32個のサブクローンで、メガ染色体の断片もしくは転位部分が認められた。メガ染色体を有する26個のサブクローンを、2ヶ月間にわたって、非選択条件下で培養した。26個のサブクローン中19個で、メ

ガ染色体が保持された。メガ染色体を失ったサブクローンはいずれも、ハイグロマイシンBに感受性となり、 β -ガラクトシダーゼ発現がなく、

両方のマーカーがメガ染色体に連結していることを示していた。

さらなる実験用に選択した2つの亜細胞系(G3D5およびH1D3)は、選択条件下で100を超える世代でメガ染色体の形態に変化はなかった。G3D5細胞は、G418含有培地での19C5×Ha4細胞の成長と、それに続く再度のBrdu処理によって得られたものであったが、H1D3細胞は、ハイグロマイシン含有培地での19C5×Ha4細胞の培養とそれに続く再度のBrdu処理によって得られたものであった。

B. メガ染色体の構造

以下の結果は、真正染色質終端部分、組み込み外来DNA（および例示の実施態様の場合にはrDNA配列）は別として、メガ染色体全体が構成異質染色質であり、40ブロック[約7.5Mb]以上のマウス主要付随DNA[図2および3参照]の縦列配置を有する。4つの付随DNAブロックは、各末端に組み込み外来DNA配列を有する巨大な回文構造[アンプリコン]に構成されている。次中部動原体染色メガ染色体の長腕および短腕はそれぞれ、6個のアンプリコンおよび4個のアンプリコンを有する。当然のことながら、各成分の固有の構成および大きさは生物および増幅事象が開始する染色体によって異なる。

り得るものである。

1. 主として異質染色質で構成されたメガ染色体

終端領域および組み込み外来DNAを除き、メガ染色体は主として、異質染色質から構成される。これはメガ染色体のC分染法によって明らかになっており、構成異質染色質の染色特性が陽性となっている。終端領域および組み込み外来DNAは別として、メガ染色体全体は異質染色性であるように思われる。マウス主要付随DNAはマウス染色体の挟動原体構成異質染色質の主要成分であり、総DNAの約10%である[Waring et al. (1966) *Science* 154:791-794]。in situハイブリタイゼーションにマウス主要付随DNAプローブを用いると、終端領

域を除いて、メガ染色体全体に強力なハイブリダイゼーションが認められた。そのハイブリダイゼーションは、分割パターンを示した。4つの大きいブロックが短腕に現れ、通常は4～7ブロックが長腕に認められた。これらの部分を、約15 Mbの主要付随DNAを有する正常マウス染色体の挟動原体領域と比較することで、メガ染色体上の主要付随DNAのブロックの大きさが、約30 Mbであると推定された。

真正染色質に特異的なマウスプローブ [pMCPE1.51 ;

マウス長分散反復DNAプローブ] を用いたら、H1D3ハイブリッド胚細胞系のメガ染色体の終端部分のみで、ハイブリダイゼーション陽性が検出された。G3D5ハイブリッドでは、ハムスター特異的プローブによるハイブリダイゼーションによって、いくつかのメガ染色体が長腕にハムスター起源の終端部分を有することが明らかになった。この所見は、これら染色体での終端部分の獲得がハイブリッド細胞で起きていること、ならびにメガ染色体の長腕が形成されて間もない腕であることを示していた。マウス染色体の動原体に特異的なマウスの少量付随プローブを用いると [Wong et al. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16:11645-11661]、強力なハイブリダイゼーション信号がメガ染色体の一次くびれのみで検出され、それはヒト抗動原体血清 [LU851] によって生じる陽性の免疫蛍光信号と同じ位置であった。

pH132、pCH110およびλ DNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーション実験からは、全ての異種DNAがマウス主要付随DNA部分間のギャップにあることが明らかになった。マウス主要付随DNAの各部分の境界には、二重バンドの異種DNAが存在する長腕の第2の部分を除き、狭バンドの組み込み異種DNAがあり、そこには主要付随DNA部

分がないか、あるいはかなり少ないことを示していた。この染色体領域は、メガ染色体の長腕を確認する上での有用な細胞学的マーカーとして役立った。1個の染色分体で部分全体の形成が起こった場合は、これら欠落付随DNAブロックの「復旧」が 10^{-4} の頻度で認められた。

ヘキスト33258処理(50 μ g/mLで16時間)後、メガ染色体は、終端部分を除き、その全長にわたって低凝縮を示した。これによって、比較的高い分解能で、メガ染色体の構造を調べる事が可能となった。低凝縮メガ染色体でのマウス主要付随プローブによるin situハイブリダイゼーションでは、約30Mbの主要付随部分が、狭バンドの非ハイブリダイゼーション配列によって互いに分離された約7.5Mbの4個のブロックから構成されていることが示された[図3]。LMTK⁻細胞系およびA9細胞系からの中部動原体マウス染色体における挟動原体異質染色質の大きいブロックで、同様の分割化を認めることができる。

2. 2個の縦列約7.5Mbブロックとそれに続く反転ブロックを有する部分から構成されたメガ染色体

マウス細胞を単一S期の間、BrdUの存在下に成長させた

場合、マウス主要付随体のDNAの2個の鎖の間でチミジン含有量に非対称性があることから、構成異質染色質はFPG染色後に側面非対称を示す。さらに、19C5×Ha4ハイブリッドでは、マウス線維芽細胞のチミジンキナーゼ[Tk]欠乏が、ハムスターTk遺伝子によって補完されて、BrdU組み込み実験が可能であった。

メガ染色体の驚くべき構造上の規則性が、FPG法を用いて検出された。いずれの染色分体においても、メガ染色体の外観を格子模様とする暗および明の交互の染色が認められた。同様の見かけが、フルオレセイン接合抗BrdU抗体による標識によって得られた。これらの外観をメガ染色体の分割された外観と比較することで、1個の暗および1個の明FPGバンドが、約30Mbのメガ染色体部分1個に相当することが明らかになった。これらの結果は、約30Mb部分の両半分が反転した配向を有することを示唆している。これは、in situでのハイブリダイゼーションと同じ染色体でのフルオレセイン接合抗BrdU抗体による取り込みBrdUの免疫標識とを併用することで確認された。このメガ染色体の約30Mbの部分[またはアンプリコン]はマウス主要付随DNAの4個のブロックから構

成されていることから、一つの部分内に、縦列の約7.5 Mbブロック2個に続いて、2個の反転ブロックがあると言える。

パルスフィールド電気泳動および「外来」DNAプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによるメガ染色体DNAの大量マッピングにより、簡単なパターンの制限断片が明らかになった。組み込み外来DNA配列において開裂部位がないか一つだけであるエンドヌクレアーゼを用い、次にhygプローブによるハイブリダイゼーションを行ったところ、1～4個の主要断片が検出された。メガ染色体には10～12個のアンプリコンがあり、そのアンプリコン当たり推定で3～8個のhyg配列のコピーがあることから（メガ染色体当たり30～90個のコピー）、ハイブリダイゼーション断片数が小さいということは、増幅部分においてDNAが均一であることを示している。

3. メガ染色体の走査型電子顕微鏡測定による上記所見の確認

メガ染色体の異質染色質腕の均一な構成が、高分解能走査型電子顕微鏡観察によって確認された。ヘキスト33258で処理したメガ染色体の延長腕およびマウス染色体の挟動原体異質染色質領域は同様の構造を示した。構成異質染色質領域は、真

正染色質部分よりコンパクトであるように見えた。終端領域は別として、メガ染色体の両方の腕は完全に延長され、かすかな窪みを示しており、それは非増幅染色体とメガ染色体における付随DNAブロックの境界に相当するはずである。ヘキスト処理を行わない場合、その溝はメガ染色体腕におけるアンプリコン境界に相当するよう思われた。さらに動原体は、周囲の異質染色質よりコンパクトで細かい繊維状外観を示していた。

4. rRNA遺伝子配列を有する1B3細胞のメガ染色体

異種DNAの組み込み部位の領域におけるメガ染色体の配列を、クローニング法を用いたその領域の単離および得られたクローンの配列分析によって調べた。この分析の結果は、異種DNAが、メガ染色体に含まれるマウスリボソームRNA遺伝子（すなわち、rDNA）付近に異種DNAが局在することを示していた。

a. 異種DNAを組み込んだメガ染色体の領域のクローニング

本明細書に記載の方法（実施例10参照）に従った蛍光活性化細胞選別法を用いて、メガ染色体を1B3細胞（反復BrdU処理とH1×HE41細胞（図4参照）の単一細胞クローニングによって得られ、切断メガ染色体を有するもの）から単離

した。内因性染色体からのSATAC（メガ染色体）の分離後、単離したメガ染色体をGH緩衝液（100mMグリシン、1%ヘキシレングリコール、飽和水酸化カルシウム溶液でpH8.4～8.6に調節したもの；実施例10参照）に保存し、0.5M EDTA中のアガロース床に遠心して入れた。

異種DNAの組み込み部位の領域周囲のメガ染色体の大量マッピングから、それがNotI用の認識部位のようなレアカッティング（rare-cutting）酵素部位を有する配列で豊富であることが明らかになった。さらに、マウス主要付随DNA（メガ染色体の大部分を構成する）は、NotI認識部位を持たない。従って、異種DNA組み込み部位と関連するメガ染色体領域の単離を容易にするため、単離したメガ染色体を8bpのGC認識部位を有するレアカッティング制限エンドヌクレアーゼであるNotIで開裂させた。メガ染色体の断片を次のように、プラスミドpWE15（Stratagene, La Jolla, California）に挿入した。単離SATACを有する100μLの低融点アガロースブロック（メガプラグ）の半量を、NotIで37℃にて終夜消化させた。次に、メガプラグを溶融させ、消化プラスミド、連結緩衝液およびT4リガーゼと混合した。連結は16℃

で終夜実施した。細菌DH5α細胞を連結生成物によって形質転換させ、形質転換した細胞をLB/Amp平板で平板培養した。15～20個のコロニーを各平板で増殖させて、計189個のコロニーを得た。プラスミドDNAを、LB/Amp培地での増殖を生き残ったコロニーから単離し、サザンブロットングハイブリダイゼーションにより、pUC19プローブに対してハイブリダイゼーションしたDNAの存在について分析した。このスクリーニング方法によって、全てのクローン、挿入物を持たないがpWE15プラスミドを有するクローンさえも

検出されるようになった。挿入DNAを有するクローンは、異種DNAの組み込み部位にある非付随GC豊富メガ染色体DNA配列を有すると予想されよう。いずれのコロニーも、ハイブリダイゼーションDNAについては陽性であった。

189の全ての形質転換体の液体培養物を用いてコスミドの微小サンプルを得て、挿入DNA内の制限部位分析に供した。最初の189のコスミドコロニー中6コロニーが挿入物を有していた。これらのクローンは28（約9 kbの挿入物）、30（約9 kbの挿入物）、60（約4 kbの挿入物）、113（約9 kbの挿入物）、157（約9 kbの挿入物）および161

（約9 kbの挿入物）と称した。制限酵素分析から、これらクローン中で3個（113、157および161）が同じ挿入物を有していることがわかった。

b. プロープとしてメガ染色体の単離部分を用いるin situハイブリダイゼーション実験

クローン30、113、157および161からの挿入DNAを精製し、標識し、いくつかの細胞系のin situハイブリダイゼーション試験におけるプロープとして使用した。ヨウ化プロピジウムを用いた細胞の対比染色によって、ハイブリダイゼーションの細胞部位を確認しやすくした。細胞中で検出された信号の位置を、以下の表にまとめてある。

細胞の種類	プローブ	信号の位置
ヒトリンパ球（男性）	No.161	動原体領域の4～5個の末端動原体染色体対
マウス脾臓	No.161	4対の染色体の末端動原体末端
EC3/7C5細胞	No.161	ミニ染色体と元二動原体染色体の末端。中部動原体マウス染色体の一つの挟動原体異質染色質。他のマウス染色体の一部の動原体領域。
K20 チャイニーズハムスター細胞	No.30	6対以上の染色体の末端。短い染色体上の中間（interstitial）信号
HB31細胞（繰り返し BrdU 処理と単一細胞クローニングによる H1D3 細胞由来のマウス-ハムスターハイブリッド細胞で、メガ染色体を有するもの）	No.30	12対以上の染色体の末端動原体末端。ある種の染色体の動原体およびメガ染色体。メガ染色体のアンプリコンの境界。
マウス脾臓細胞	No.30	プローブ No.161 で認められる信号と同様。5対の染色体の動原体。挟動原体異質染色質に対する弱い交差ハイブリダイゼーション。
HB31細胞	No.113	プローブ No.30 で認められる信号と同様。
マウス脾臓細胞	No.113	5対の染色体の動原体領域
K20細胞	No.113	6対以上の染色体。一部の末端小粒での弱い信号といくつかの中間信号。
ヒトリンパ球（男性）	No.157	プローブ No.161 で認められる信号と同様

c. プローブとしてメガ染色体の単離部分を用いるサザンブロットティングハイブリダイゼーション

マウス脾臓組織、マウス LMTK⁻細胞、K20チャイニーズ

ハムスター卵巣細胞、EJ30ヒト線維芽細胞およびH1D3細胞からDNAを単離した。単離したDNAとラムダファージDNAについて、メガ染色体クローンNo. 30、113、157および161から単離した挿入物をプローブとして用いるサザンブロットティングハイブリダイゼーションを行った。プラスミドp

WE15を陰性対照プローブとして用いた。4つのメガ染色体クローン挿入物のそれぞれを、ラムダファージDNAを除くDNAサンプル全てに、多コピー法でハイブリダイゼーションした（ハイブリダイゼーションの強度およびハイブリダイゼーションバンド数によって示される）。プラスミドpWE15はラムダDNAのみにハイブリダイゼーションした。

d. メガ染色体クローンNo. 161の配列分析

メガ染色体クローンNo. 161は、in situ実験およびサザンハイブリダイゼーション実験で最強のハイブリダイゼーションを示すように思われ、挿入配列の分析に選択した。配列分析は、最初にコスミドクローンNo. 161のサブクローニングを行って、次のような5個のサブクローンを得ることで行った。

クローンNo. 161の挿入物の末端断片を得るため、クローンをNo t IおよびB a m H Iで消化させ、No t I/B a m

H I消化pB l u e s c r i p t K S (Stratagene, La Jolla, California) と連結させた。クローンNo. 161の挿入物の2個の断片、0.2 kbおよび0.7 kb挿入物断片を得た。クローンNo. 161の挿入物の内部断片のサブクローニングを行うため、同じ消化物をB a m H I消化pU C 1 9と連結させた。クローンNo. 161の挿入物の3個の断片、0.6 kb、1.8 kbおよび4.8 kb挿入物断片を得た。

サブクローニングした挿入物断片全ての末端について、最初に手技にて配列決定した。しかしながら、極めて高いGC含有量のため、オートラジオグラフは解釈が困難で、ABIシーケンサおよび染料終止暗号サイクルプロトコルを用いて配列決定を繰り返した。その配列データとGENBANKデータベースにある配列とを比較したところ、クローンNo. 161の挿入物がGENBANK受託番号X82564（本明細書では配列番号16として示してある）で示された位置7551～15670の間のマウスリボソームRNA遺伝子（rDNA）反復単位の内部部分に相当することがわかった。クローンNo. 161の挿入物について得られた配列データを配列番号18～24に示してある。具体的には、個々のサブクローンは、GENBA

NK受託番号X82564（すなわち、配列番号16）および配列番号18～24における以下の位置に相当していた。

サブクローン	開始	終了	部位	配列番号
	X82564 で			
161k1	7579	7755	<u>NotI</u> , <u>BamHI</u>	18
161m5	7756	8494	<u>BamHI</u>	19
161m7	8495	10231	<u>BamHI</u>	20(ヌクレオチド 8495～8950 に相当する配列のみ示す) 21(ヌクレオチド 9851～10231 に相当する配列のみ示す)
161m12	10232	15000	<u>BamHI</u>	22(ヌクレオチド 10232～10600 に相当する配列のみ示す) 23(ヌクレオチド 14267～15000 に相当する配列のみ示す)
161k2	15001	15676	<u>NotI</u> , <u>BamHI</u>	24

配列番号18～24に示した配列は、GENBANK受託番号X82564の位置7551～15670で示された配列とは一部の位置が異なっている。そのような相違は、rDNAの反復単位間のランダム突然変異が原因であると考えられる。クローン161の配列分析の結果はそれがrDNAに相当することを示したか、それはそのクローンがヒトリンパ球およびマウス脾臓細胞で形成したin situハイブリダイゼーション信号の外観と相関性がある。ハイブリダイゼーション信号は、これら

細胞における末端動原体染色体で明瞭に認められ、そのような種類の染色体は、その染色体の短腕にある挟動原体付随DNAに隣接するrDNAを含むことが知られている。さらに、rRNA遺伝子は哺乳動物において非常に保存度が高く、それはヒト染色体DNAに対するクローンNo. 161の生物間交差ハイブリダイゼーションによって裏付けられる。

rDNAで認められるもののような増幅一複製制御領域を単離するため、H1D3細胞などのメガ染色体を有する細胞から単離したDNAに対して、例えば以

下のプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、核酸増幅を行うことが可能である。

増幅制御要素順プライマー（1～30）

5'-GAGGAATTCCCCATCCCTAATCCAGATTGGTG-3'（配列番号25）
増幅制御要素逆プライマー（2142～2111）

5'-AAACTGCAGGCCGAGCCACCTCTCTTCTGTGTTTG-3'（配列番号26）
複製領域順プライマーの起源（2116～2141）

5'-AGGAATTCACAGAAGAGAGGTGGCTCGGCCTGC-3'（配列番号27）
複製領域逆プライマーの起源（5546～5521）

5'-AGCCTGCAGGAAGTCATACCTGGGGAGGTGGCCC-3'（配列番号28）
C. メガ染色体形成の概要

図2に、マウスLMTK⁻細胞系における二動原体染色体の形成から始まる安定なメガ染色体の形成に至る事象を示してある。（A）λCM8およびλgtWESneoによるLMTK⁻細胞のトランスフェクション後のマウス7番染色体の動原体領域での1回のE型増幅により組み込み外来DNAに連結したneo^r動原体を得て、二動原体染色体を形成する。複数回のE型増幅によってλneo染色体を形成する。それは7番染色体由来のものであり、マウス-ハムスターハイブリッド細胞系で安定化したものである。（B）二動原体7番染色体の動原体間の特異的切断により、neo^r動原体を有する染色体断片と、末端に外来DNAの痕跡を有する7番染色体とを形成する。（C）neo^r動原体を有する断片の反転複製により、安定なneo^rミニ染色体を形成する。（D）元二動原体7番染色体の外来DNA領域への外因性DNAの組み込みによってH型増幅を行い、異質染色質腕を形成する。真正染色質終端部分を捕捉することで、この新たな染色体腕を「ソーセージ」染色体の形で安定化させる。（E）BrdU処理および／または薬剤選別によってさらにH型増幅が誘発され、それによって不安定なギガ染

色体が形成されるように見える。（F）繰り返しBrdU処理および／または薬剤選別により、動原体複製を含むさらなるH型増幅を誘発し、それによって別の

異質染色質染色体胞を形成する。染色体切断によって、それを7番染色体から切り離し、末端部分を獲得させて、安定なメガ染色体を形成する。

D. メガ染色体またはその誘導体を有する細胞系でのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシントランスフェラーゼ遺伝子の発現

メガ染色体またはその誘導体を有する細胞系での異種遺伝子（すなわち、β-ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシントランスフェラーゼ遺伝子）発現のレベルを量的に測定した。異種遺伝子のコピー数間の関係およびそれから発現される蛋白のレベルも測定した。

1. 材料および方法

a. 細胞系

上記のような250～400Mbのメガ染色体を有するH1D3細胞と50～60Mbのミクロメガ染色体を有するmM2C1細胞の異種遺伝子発現レベルを量的に評価した。H1×He41細胞系（メガ染色体ならびにCD4およびneo遺伝子を

有する単一のヒト染色体を有するマウス-ハムスター-ヒトハイブリッド細胞系；図4参照）の再度のBrdU処理および単一細胞クローニングによって、mM2C1細胞を形成した。F12培地中で、選択条件（120μg/mLハイグロマイシン）もしくは非選択条件下に、その細胞系を成長させた。

b. β-ガラクトシダーゼアッセイのための細胞抽出物の取得

mM2C1もしくはH1D3細胞培養物の単層を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で3回洗浄した。細胞をゴム製ポリスマンで掻き取り、懸濁させて、再度PBSで洗浄した。洗浄した細胞を0.25Mトリス-HCl（pH7.8）に再懸濁させ、液体窒素中での冷凍および37℃での解凍を3サイクル行って破壊した。抽出液を4℃にて12000rpmで5分間遠心することで透明とした。

c. β-ガラクトシダーゼアッセイ

β-ガラクトシダーゼアッセイ混合物は、1mMのMgCl₂、45mMのβ-メルカプトエタノール、0.8mg/mLのo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドおよび66mMのリン酸ナトリウム（pH7.5）を含んでい

た。反応混合物を細胞抽出物とともに時間を長くして37℃でインキュベ-

ションした後、3倍容量の1M Na_2CO_3 を加えることで反応を停止し、420nmで光学密度を測定した。細胞抽出物を加えずにインキュベーションしたアッセイ混合物を対照として用いた。反応の直線範囲を測定したところ、0.1~0.80 D_{420} であった。 β -ガラクトシダーゼ活性1単位を、37℃で1分間に3nmolの α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを加水分解する酵素量と定義する。

d. ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼアッセイのための細胞抽出物の取得

細胞を上記のように洗浄し、20mMのヘ pes (Hepes) 緩衝液 (pH 7.3)、100mMの酢酸カリウム、5mMの酢酸マグネシウムおよび2mMのジチオトレイトールに再懸濁させた。微小先端プローブを用い、MSE超音波破碎機中0℃で10秒間印加を6回行うことで、細胞を破壊した。各超音波印加後1分間、細胞を放冷した。抽出物を微量遠心管中、2000rpmで1分間遠心することで透明とした。

e. ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼアッセイ

ホスホセルロース紙結合アッセイ (Haas and Dowding (1975), *Meth. Enzymol.* 43:611-628に記載のもの) によって、酵素活

性を測定した。細胞抽出物に、0.1Mの塩化アンモニウムおよび1mMのアデノシン- γ - ^{32}P -トリホスフェート (比放射能: 300Ci/mmol) を補給した。0.1mg/mLのハイグロマイシンを加えて反応開始し、長い時間にわたって37℃でインキュベーションした。水浴で75℃にて5分間サンプルを加熱することで反応停止し、沈殿した蛋白を微量遠心管中で5分間遠心することで除去した後、上清の少量サンプルをワットマン (Whatman) P-81ホスホセルロース紙 (2cm²) にスポットとしてしみ込ませた。室温で30秒後、紙を高温 (75℃) 蒸留水500mLに3分間入れた。この条件下で放射性ATPが溶液中に残っている間、ハイグロマイシンホスフェートはホスホセルロースに強

力かつ定量的に結合している。紙を蒸留水500mL中で3回すすぎ、ベックマン(Beckman)液体シンチレーションカウンタで、トルエンシンチレーションカウンタ中にて、結合している放射能を測定した。ハイグロマイシンを加えずにインキュベーションした反応混合物を対照とした。

f. 異種遺伝子のコピー数の測定

細胞のSDS溶解とそれに続くプロテイナーゼK処理および

フェノール/クロロホルム抽出が関与する標準的な精製プロトコールを用いて、DNAをH1D3およびmM2C1細胞から得た。単離DNAを適切な制限エンドヌクレアーゼで消化させ、アガロースゲルで分別し、ナイロンフィルターに吸い取らせ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子もしくはハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子由来の放射性プローブとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションのレベルを定量した(Molecular Dynamics PhosphorImage Analyzerにて)。異なった細胞系から負荷したDNAの総量を補正するため、フィルターを単一コピー遺伝子で再プロービングし、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子を単一コピー遺伝子ハイブリダイゼーションに対して正規化した。

g. 蛋白濃度の測定

細胞抽出物の総蛋白量を、標準としてウシ血清アルブミンを用いるブラッドフォード比色分析によって測定した。

2. H1D3細胞およびmM2C1細胞で発現される β -ガラクトシダーゼおよびハイグロマイシンホストランスフェラーゼ活性の特性決定

量的条件を確立するため、 β -ガラクトシダーゼおよびハイ

グロマイシンホストランスフェラーゼ活性の最も重要な動力学的パラメータについて調べた。この比色分析で測定した β -ガラクトシダーゼ活性は、mM2C1およびH1D3細胞系の両方について、0.1~0.8OD₄₂₀の範囲で線形であった。 β -ガラクトシダーゼ活性は、いずれの細胞系においても、総蛋白濃度範囲5~100 μ g以内で反応混合物に加えた蛋白量にも比例していた。mM

2C1およびH1D3細胞系のハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性は、 β -ガラクトシダーゼについて記載の条件下での反応時間または加えた細胞抽出物の総量にも比例していた。

a. mM2C1およびH1D3細胞系の β -ガラクトシダーゼ活性の比較

対数増殖期mM2C1およびH1D3細胞系から得られた細胞抽出物について β -ガラクトシダーゼ活性を調べ、10回の独立の実験で比活性を比較した。H1D3細胞抽出物の β -ガラクトシダーゼ活性は、 $440 \pm 25 \text{ U/mg 総蛋白}$ であった。同じ条件下で、mM2C1細胞抽出物の β -ガラクトシダーゼ活性は $1/4.8$ であり、 $92 \pm 13 \text{ U/mg 総蛋白}$ であった。

H1D3およびmM2C1細胞系の高分散、分散およびほぼ

集密の培養液の β -ガラクトシダーゼ活性も比較した。これらの実験では、対数的に細胞数が異なったH1D3細胞およびmM2C1細胞を、一定容量の培地に接種し、標準的条件下に3日間成長させた。異なる細胞密度で成長させた細胞培養物の β -ガラクトシダーゼ比活性に有意差は認められず、H1D3/mM2C1 β -ガラクトシダーゼ比活性も、3つの細胞密度のいずれにおいても同様であった。しかしながら、H1D3もしくはmM2C1細胞の集密で静止した細胞培養物では、恐らくは接触阻害の結果としての細胞分裂停止のために β -ガラクトシダーゼの発現は有意に低かった。

b. H1D3およびmM2C1細胞系のハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性の比較

細菌ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼは、H1D3またはmM2C1細胞系に膜結合型で存在する。これは、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性を、これら細胞抽出物の高速遠心によって完全に排除ことができ、その酵素活性は高速ペレットを再懸濁することで回復できるという所見によるものである。

H1D3およびmM2C1細胞系における酵素の比活性の比

は、 β -ガラクトシダーゼ活性と同様であった。すなわち、H1D3細胞は、m

M2C1細胞と比較して4.1倍の比活性を有している。

c. 非選択条件下で成長させたH1D3およびmM2C1細胞におけるハイグロマイシンホストランスフェラーゼ活性

ハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子の発現レベルを、30世代にわたって非選択条件下で成長させたH1D3およびmM2C1細胞系における比酵素活性定量に基づいて測定した。培地にハイグロマイシンがないことは、ハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子の発現に影響しなかった。

3. H1D3およびmM2C1細胞系におけるβ-ガラクトシダーゼおよびハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子コピー数の定量

前述のように、β-ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子は、メガ染色体、すなわちH1D3およびmM2C1細胞におけるミクロメガ染色体内のみにある。H1D3およびmM2C1細胞系から単離したDNAのゲノムサザンプロットの定量分析 (PhosphorImage

Analyzerによる) から、メガ染色体に組込んだβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のコピー数は、mM2C1細胞の場合と比較してH1D3細胞の方が約10倍であることがわかった。ハイグロマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子のコピー数は、mM2C1細胞の場合と比較してH1D3細胞の方が約7倍である。

4. メガ染色体またはその誘導体を有する細胞での異種遺伝子発現の定量結果の概要と結論

異質染色質メガ染色体における細菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子を有する高等真核生物 (例: H1D3細胞) のβ-ガラクトシダーゼ活性の定量測定により、細胞染色法によって検出される組込み細菌遺伝子が高レベルで発現するのが認められることが確認された。遺伝子導入動物における外来遺伝子の発現についての研究の報告では、導入遺伝子発現は正確な組織および発達の特異性を示すが、発現レベルは低いのが普通であり、広範囲の位置依存性の変動性を示す (すなわち、導入遺伝子発現のレベルは、染色体組込みの部位によって決まる) ことが明らかになっている。導入遺伝子の発現が低レベルであるのは、導入遺伝子を周囲の染色質の阻害効果から絶縁し、有効な遺伝子

発現に必要な活性染色質構造の形成を促進する特殊なDNA配列がないためであると仮定されている。この位置依存的変動性を無効にし得て、高等真核生物における導入遺伝子座作用性領域(LAR)配列および下等真核生物における固有の染色質構造(ss)要素の高レベル発現を保証できるいくつかのシス作用性DNA配列要素が確認されている(例えば、Eissenberg and Elgin (1991) Trends in Genet. 7:335-340参照)。これらのシス作用性DNA配列がない場合、導入遺伝子発現のレベルは低く、コピー数依存性である。

H1D3およびmM2C1細胞の異質染色質メガ染色体に含まれる細菌 β -ガラクトシダーゼ受容体遺伝子は強力な真核生物プロモーターエンハンサー要素によって作用するが、特異的シス作用性DNA配列要素を設計したり、それを境界要素として機能すると考えられる細菌DNA構築物に組み込んではいない。そこで、特にメガ染色体における β -ガラクトシダーゼ遺伝子が、遺伝子発現を遮断できることが知られている長くコンパクトな異質染色質環境にあることから、これらの細胞で測定される高レベル β -ガラクトシダーゼ発現は重要である。メガ染色体は、遺伝子発現に対する異質染色質の阻害効果を克服

するよう機能する細菌DNA配列に関連して、DNA配列要素を有するようになる。

メガ染色体における異種遺伝子発現の特異性は、 β -ガラクトシダーゼ発現レベルがコピー数依存性であるという所見によっても裏付けられる。全長メガ染色体を有するH1D3細胞系では、 β -ガラクトシダーゼの比活性は、比較的小さく切断された形のメガ染色体のみを有するmM2C1細胞の約5倍である。定量的ハイブリダイゼーション法によるH1D3およびmM2C1細胞系における β -ガラクトシダーゼ遺伝子コピーの数の比較から、 β -ガラクトシダーゼの発現がコピー数依存性であることが確認された。組込み β -ガラクトシダーゼ遺伝子コピー数は、H1D3細胞の方がmM2C1細胞の約10倍である。そこで、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子のコピー数を多く有する細胞系では、 β -ガラクトシダーゼ活性レベルは高くなり、それは発現のコピー数依存性を裏付けるものである。メガ染色体の異なる誘導体を有する細胞系における β -ガラクトシダーゼレ

ベルおよびハイグロマイシンホストランスフェラーゼ酵素レベルのコピー数依存性は、細菌遺伝子の組込み部位を囲む染色質配置およびメガ染色体の異質染色質環境のいずれも

遺伝子発現を抑制しないことを示している。

H 1 D 3 細胞で発現される β -ガラクトシダーゼ蛋白の相対量を、この酵素の V_{\max} [均一な結晶化細菌 β -ガラクトシダーゼ (Naider *et al.*, (1972) *Biochemistr* 11: 3202-3210) の場合 500] および H 1 D 3 細胞蛋白の比活性に基づいて推定することができる。500 という V_{\max} は、均一な β -ガラクトシダーゼ蛋白が 37℃ で酵素蛋白 1 mg 当たり 1 分間に基質 500 μ mol を加水分解することを意味している。総 H 1 D 3 細胞蛋白抽出物 1 mg が、37℃ で毎分 1.4 μ mol の基質を加水分解することができる。すなわち H 1 D 3 細胞抽出物中に存在する蛋白の 0.28% が β -ガラクトシダーゼである。

ハイグロマイシンホストランスフェラーゼは、H 1 D 3 および mM 2 C 1 細胞中に膜結合した形で存在する。その酵素が高等真核生物細胞で膜中に組み込まれる傾向は、それが原核生物細胞において細胞周辺に局在することと関係があると考えられる。細菌ハイグロマイシンホストランスフェラーゼは、均一になるまで精製されたことはない。従って、その V_{\max} は測定されていない。従って、その細胞系で発現されるハイグロマ

イシンホストランスフェラーゼ蛋白の総量について推定を行うことはできない。しかしながら、mM 2 C 1 細胞と比較して H 1 D 3 細胞におけるハイグロマイシンホストランスフェラーゼの比活性が 4 倍であることは、その発現もコピー数依存性であることを示している。

特に β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現に対する選択圧がない場合における H 1 D 3 および mM 2 C 1 細胞でのその遺伝子の発現が一定で高レベルであることは、異質染色質メガ染色体で生じる遺伝子発現が安定であることを明瞭に示している。この結論はさらに、H 1 D 3 および mM 2 C 1 細胞を非選択条件下に増殖させた場合、ハイグロマイシンホストランスフェラーゼ発現レベルが変化しな

かったという所見によっても裏付けられる。細菌マーカー遺伝子の常に高レベルな、安定した、コピー数依存的発現は、メガ染色体が外来遺伝子の発現に対する理想的ベクター系であることを明瞭に示している。

実施例 7

構築された SATAC および ミニ染色体を有する細胞系の一部についての概要

1. EC3/7 由来細胞系

マウス線維芽細胞系である LMTK⁻ 由来細胞系を、 λ CM8 および λ gtWESneoDNA でトランスフェクションして [実施例 2 参照]、形質転換細胞系を得た。これらの細胞系には、受託番号 90051001 下に ECACC (European Collection of Animal Cell Culture) に寄託された EC3/7 があった [米国特許 5288625 号参照; Hadlaczky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8106-8110 および 米国特許出願 08/375271 号も参照]。この細胞系は、neo-動原体を有する二動原体染色体を有する。再クローニングおよび選別によって、安定な neo-ミニ染色体および元二動原体染色体を有する細胞系である EC3/7C5 などの細胞系を得た [図 2C 参照]。

2. KE1-2/4 細胞

EC3/7 の CHO-K20 細胞との融合および G418/HAT による選別によってハイブリッド細胞系が得られ、その

中に KE1-2/4 があって、それは受託番号 96040924 下に ECACC に寄託してある。KE1-2/4 は、 λ neo 染色体を有する安定な細胞系であり [図 2D 参照; 米国特許 5288625 号も参照]、E 型増幅によって得られたものである。KE1-2/4 は、 λ DNA、プロマイシン耐性遺伝子などの選択可能マーカー、p53 および 抗 HIV リボザイム遺伝子などの対象遺伝子を有するベクターでトランスフェクションされている。これらのベクターは、染色体中の異種 DNA による相同組換えによって λ neo 染色体中に対象遺伝子を導入する。

3. C5pMCT53 細胞

EC3/7C5細胞系をpH132、pH110およびλDNAならびに他の構築物と共トランスフェクションしている（実施例2参照）。各種クローンおよびサブクローンが選別されている。例えば、p53をコードするDNAを有する構築物による形質転換によって、C5pMCT53と称される細胞を得た。

4. TF1004G24細胞

前述のように、プラスミド〔ファルマシアから入手のpH

132、pCH110; Hall et al. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2:101-109も参照] およびλDNA [λc1875Sam7 (New England Biolabs)] とのEC3/7C5細胞の共トランスフェクションによって、形質転換細胞を得た。これらの中には、neo-ミニ染色体中で抗HIVリボザイムをコードするDNAを有するTF1004G24がある。TF1004G24の再クローニングによって、多くの細胞系が得られた。その中にはNHHL24細胞系がある。この細胞系も、neo-ミニ染色体に抗HIVリボザイムを有し、高レベルのβ-galを発現する。それをCHO-K20細胞と融合させて、各種ハイブリッドを得た。

5. TF1004G19由来細胞

TF1004G形質転換体の再クローニングおよび選別によって、不安定なソーセージ染色体およびneo-ミニ染色体を有する、実施例4で前述した細胞系TF1004G19を得た。単一細胞クローニングによって、安定なソーセージ染色体およびneo-ミニ染色体を有するTF1004G-19C5〔図4参照〕細胞系を得た。TF1004G-19C5をCHO細胞と融合させて、ハイブリッドを選択条件下に成長させて、1

9C5×Ha4および19C5×Ha3細胞系〔実施例4参照〕およびその他の細胞系を得た。19C5×Ha3細胞系の再クローニングによって、ギガ染色体を有する細胞系、すなわち細胞系19C5×Ha47（図2E参照）を得た。19C5×Ha4細胞のBrdU処理および選択条件下〔ネオマイシン（G）および/またはハイグロマイシン（H）〕での成長によって、G3D5およびG4D

6細胞系ならびに他の細胞系などのハイブリッド細胞系が得られている。G3D5はneo-ミニ染色体およびメガ染色体を有している。G4D6は、neo-ミニ染色体のみを有する。

H培地での19C5×Ha4細胞の再クローニングによって多くのクローンが得られた。その中には、安定なメガ染色体を有するH1D3〔図4参照〕がある。再度のBrdU処理およびH1D3細胞の再クローニングによってHB31細胞系が得られており、それをpTEMPUD、pTEMPU、pTEMPU3およびpCEPUR-132ベクターによる形質転換に用いた〔以下の実施例12および14参照〕。

H1D3を、プラスミドにCD4およびネオマイシン耐性をコードするDNAを有するCD4⁺He1a細胞系と融合させ

ている〔例えば、そのHe1a細胞について記載している米国特許5413914号、5409810号、5266600号、5223263号、5215914号、5144019号参照〕。GHによる選別によって、メガ染色体とCD4neo構築物を含む単一のヒト染色体を有するH1×HE41〔図4参照〕などのハイブリッドを得ている。再度のBrdU処理および単一細胞クローニングによって、メガ染色体を有する細胞系を得ている〔細胞系1B3；図4参照〕。1B3細胞の約25%が切断メガ染色体〔約90～120Mb〕を有する。これらサブクローンの別のものである2C5と称されるものを、含ハイグロマイシン培地で培養し、メガ染色体を含まない細胞系を得て、G418を含む培地で成長させた。これら細胞の再クローニングによって、矮小メガ染色体〔約150～200Mb〕を有する1B4その他の細胞系、ならびにマイクロメガ染色体〔約50～90Mb〕を有する11C3およびmM2C1などの細胞系を得た。細胞系mM2C1のマイクロメガ染色体は末端小粒を持たない。しかしながら、所望に応じて、本明細書で記載および生成したものなどの合成末端小粒をmM2C1細胞マイクロメガ染色体に付加することができる。マイクロメガ染色体を有するm

M2C1細胞系などの比較的小さい切断メガ染色体を有する細胞系を用いて、さ

らに小さいメガ染色体（例えば、大きさが約10～30Mb）を形成することができる。これは例えば、これら細胞をX線照射、Br d Uもしくは末端小粒指向 in vivo染色体断片化に曝露することで、その細胞におけるミクロメガ染色体を切断および断片化することで行うことができる。

実施例8

メガ染色体の複製

メガ染色体の均一構造により、構成異質染色質の複製についての詳細な分析を行う特有の機会が得られる。

A. 材料および方法

1. 細胞系の培養

メガ染色体を有するH1D3マウス-ハムスターハイブリッド細胞〔実施例4参照〕を、10%ウシ胎仔血清〔FCS〕および400 μ g/mLハイグロマイシンB〔Calbiochem〕を含むF-12培地で培養した。G3D5ハイブリッド細胞〔実施例4参照〕を、10%のFCS、400 μ g/mLのハイグロマイシンB（Calbiochem）および400 μ g/mLのG418〔SIGMA〕を含むF-12培地で維持した。マウスA9線維芽細胞を、10%FCSを補給したF-12培地で培養した。

2. Br d U標識

代表的な実験では、並行して20～24個の半集密細胞培養物を10cmシャーレに準備した。プロモデオキシウリジン（Br d U）（Fluka）を、NaOH 1滴でアルカリ性とした蒸留水に溶かして、 10^{-2} M原液を得た。このBr d U原液10～50 μ Lずつを各10mL培地に加えて、Br d Uの最終濃度を10～50 μ Mとした。細胞をBr d U存在下に30分間培養し、温完全培地で洗浄し、用時までBr d U不在下にインキュベーションした。この時点で、5 μ g/mLのコルヒチンをサンプル培養物に1時間ごとまたは2時間ごとに加えた。1～2時間のコルヒチン処理後、有糸分裂細胞を「振り落とし（shake-off）」によって回収し、通常の染色体調製物を得て、免疫標識に供した。

3. 染色体の免疫標識およびin situハイブリダイゼーション

マウス A9 染色体の場合には 2 M塩酸を 37℃で 25 分間使用し、ハイブリッド細胞の染色体については 1 M塩酸を 37℃で 30 分間使用した以外は、メーカーの説明に従って、フルオレセイン接合抗 Br d Uモノクローナル抗体 (Boehringer) に

よる免疫標識を行った。ビオチン標識プローブによる in situハイブリダイゼーション、ならびに同一調製物についての間接免疫蛍光および in situハイブリダイゼーションを、既報の方法に従って行った [Hadlaczky et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:8106-8110; 米国特許 5 288 625 号も参照]。

4. 顕微鏡検査

観察および顕微鏡写真撮影はいずれも、顕微鏡 (Vanox AHBS; Olympus) を用いて行った。写真には、フジカラー 400 Super G またはフジカラー 1600 Super HG 高速カラーネガを用いた。

B. 結果

Br d Uパルス標識とそれに続く免疫標識によって、メガ染色体の複製を分析した。最初に in vivoでの DNA標識についての基本的パラメータを決定した。並行培地で 50 μ M Br d Uの 30 分間パルスを用いて、パルス開始から 5 分間隔で、さらには Br d U除去から 15 分～1 時間ごとにサンプリングおよび固定を行った。組み込まれた Br d Uを、フルオレセイン接合抗 Br d Uモノクローナル抗体を用いる免疫標識によって検出した。最初の時点で (5 分間)、38% の核が標識され、

Br d U存在下でのインキュベーション中は標識核の数が徐々に増加するのが認められ、Br d U除去の時点で 30 分サンプルにおいて 46%という最高値を得た。それ以上の時点 (60 分、75 分および 90 分) において、変化はほとんど認められず、標識核の割合は一定のままであった [44.5～46%]。

この結果は、(i) Br d Uの取り込みが急速なプロセスであること、(ii) 30 分間のパルス時間が S 期核の高信頼性標識には十分であること、(iii) Br d Uは洗浄によって、培地から効果的に除去できることを示している。

最終複製染色体部分での最も早いBrdU信号の出現と1回の完了した細胞周期後に染色体の染色分体の一つのみでの同一パターンの出現との間の時間を測定することで、H1D3およびG3D5細胞の細胞周期の長さを推定した。前期染色体での最初の検出可能BrdU信号の時間と標識有糸分裂法によって、G2期の長さを求めた [Qastler et al. (1959) *Exp. Cell Res.* 17:420-438]。(i) 細胞周期長さと30～120分間のパルス中に標識された核の割合に基づき、(ii) 最終複製染色体の複製の丁度終了した時点とS期開始時の染色体での最初の信号検出との間の時間を測定することで、(iii) 標識有糸分

裂法によってという3つの方法で、S期の長さを求めた。実験を繰り返して、細胞周期の期間が22～26時間であり、S期が10～14時間であり、G2期が3.5～4.5時間であることが認められた。

メガ染色体の複製分析を、コルヒチン処理の2時間後に2時間間隔で有糸分裂細胞を回収することで、並行培養にて行った。再実験で、1時間のサンプリング間隔と1時間のコルヒチン処理を行って同じ分析を行った。それら2回の方法とも同等の結果を与えたが、約30%の細胞が平均よりかなり短いもしくは長い細胞周期を有することが認められたことから、2時間サンプリング間隔の方が適切であるように見えた。個々の染色体、特に後期複製ハムスター染色体の一部の特徴的な複製パターンが、S期の異なる段階についての有用な内部マーカーとして役立った。異なった実験で細胞周期の長さが異なることで生じるエラーを低減するため、第2のS期開始時に1個の染色分体に最初の信号が認められるまで、全細胞周期にわたってサンプリングおよび分析を行った。

メガ染色体の複製順序は次の通りである。S期の最も初期では、メガ染色体の複製が染色体末端で開始する。中間位置での

最初の複製開始は通常、動原体領域で検出することができる。間もなく、なおもS期の最初の1/4期において、短腕の終端領域がほとんどその複製を完了した時に、染色体腕に沿って明瞭な開始信号が現れる。S期の第2の1/4期では、複製が進行するに連れて、BrdU標識領域が徐々に広がり、メガ染色体の格

子パターンが明瞭になる〔例えば、図 2 F 参照〕。同時に、マウス染色体の挟動原体領域も B r d U の強力な取り込みを示す。メガ染色体の複製は S 期の第 2 の 1 / 4 期と第 3 の 1 / 4 期で最高となる。S 期の第 3 の 1 / 4 期終了後および最終 1 / 4 期の丁度開始時に、メガ染色体およびマウス染色体の挟動原体異質染色質が複製を完了する。S 期終了までに、マウスおよびハムスターの最後の複製部分のみがなお、B r d U 取り込みを行っている。

ゲノム全体の複製は、明瞭な段階で起こる。S 期の前半終了まで取り込み B r d U の信号が連続的に増加したが、S 期の第 3 の 1 / 4 期が開始すると、異質染色質領域以外の染色体部分はほとんど B r d U を取り込まなかった。S 期の最終 1 / 4 期では、B r d U 信号が再度増加し、その際に最終複製部分が非常に強い取り込みを示した。

対照として、マウス A 9 細胞における複製について同様の分析を行った。免疫標識パターンの分解能を上げるため、ヘキスト 3 3 2 5 8 処理によって A 9 染色体の挟動原体領域を分散させた。周囲の真正染色質配列の強力な複製があるために、低凝集のマウス染色体であっても、異質染色質における最初の B r d U 信号の正確な位置決定は通常は困難であった。最初の信号の位置が明瞭に決定された染色体では、A 9 染色体の挟動原体異質染色質の複製は、メガ染色体の場合と同様であった。A 9 細胞の染色体も、ハイブリッド細胞におけるマウス染色体の物と同様の複製パターンおよび配列を示した。これらの結果は、メガ染色体およびマウス染色体が、ハイブリッド細胞においてその元のタイミングと特異性を保持していたことを示している。

B r d U 取り込み後に得られた開始部位のパターンと、S 期の第 1 の 1 / 4 期の詳細な分析における「外来」DNA の組込み部位の位置とを比較することで、メガ染色体のアンプリコン構造に関する複製起源（開始部位）の確認を試みた。メガ染色体の長腕での組込み DNA の二重バンドが細胞マーカーとして役立った。得られた結果は、細胞レベルで認められた B r d U と in situ ハイブリダイゼーション信号とが同じ位置にある

ことを示しており、「外来」DNA配列が複製起源のごく近傍にあって、レプリケートと付随配列との間の非付随配列に組み込まれていると推定されることを示していた〔図3参照〕。実施例6. B. 4に記載のように、メガ染色体で検出されるrDNA配列も、「外来」DNA配列の組み込み部位のアンプリコン境界に位置し、メガ染色体の複製開始を起こす複製起源にrDNA配列が関与していることが示唆される。いくつかの他の染色体の挟動原体領域では、メガ染色体における開始信号と同様の点のようなBrdU信号を認めることができる。その信号は、通常の染色体の異質染色質領域における同様の開始部位を表している可能性がある。

頻度 10^{-4} で、組み込みDNA配列の「未制御」増幅が、メガ染色体で認められた。「外来」配列がレプリケートに近接しているという仮定（上述）と一致して、この空間的に制限された増幅は、複製起源の未制御の反復点火（firing）の結果として部分全体の複製が完了しないためであると考えられる。

C. 考察

染色体の挟動原体領域の構成異質染色質は後期複製性であると考えられている〔例えば、Miller (1976) *Chromosoma* 55:

165-170参照〕。それとは対照的に、それらの実験から、異質染色質ブロックの複製がS期の前半で明瞭な開始部位にて開始し、S期のほぼ3/4期にわたって続くことが明らかになっている。この差は、次のようにして説明することができる。（i）通常の染色体では、付随DNA周囲にある活発に複製する真正染色質配列によって開始信号が不明瞭となることから、開始部位の正確な位置がわかりにくい。（ii）異質染色質の複製は、異質染色質複製物の大部分と他のほとんどの染色体領域がすでにその複製を完了しているかまたはそれをまだ開始していないS期の後半期にのみ明瞭に検出することができる。そこで、オートラジオグラフィによる放射能標識前駆体の取り込みの分析などの低分解能の細胞学的方法では、隣接する真正染色質部分がもはや複製を行っていないS期の後半で、異質染色質における顕著な複製信号を検出するのみである。

メガ染色体では、複製の最初の開始部位は、「外来」DNA配列およびrDN

A配列がアンプリコン境界で組み込まれる部位で同じ位置を占めている。同様の開始信号が、「外来」DNAを持たないマウス染色体の一部の挟動原体異質染色質において、同時に認められ、アンプリコンの境界での複製開始部位が

付随DNAブロックの非付随隣接配列にある可能性のあることを示している。各付随DNA二本鎖に第1の開始部位が存在することは、この大きい染色体部分が、第1の開始部位とその単位の各末端における終止点によって区切られた単一の巨大な複製単位「メガサイクロン」であることを示唆している。いくつかの系統の証拠から、この高次複製単位内で、「二次」起源およびレプリコンがメガレプリコンの完全な複製に寄与することが示されている。

1. メガ染色体の異質染色質領域の総複製時間は約9～11時間であった。真核生物染色体では代表的である複製フォークの運動速度毎分0.5～5 kbでは [Kornberg *et al.* (1992) DNA Replication. 2nd. Ed., New York: W.H. Freeman and Co., p.474]、約15 Mbのレプリコンの複製には50～500時間を要すると考えられる。別法として、1個のみの複製開始点を使用した場合、平均複製速度は毎分25 kb となって、10時間以内に複製が完了するはずであると考えられる。真正染色質および異質染色質の染色体部分におけるBrdU信号の強度を比較することで、それらの複製速度が5～50倍異なることを示す証拠は認められなかった。

2. 短いBrdUパルス標識を用いると、単一の複製開始点によって、複製フォークの動きを反映して、レプリコンに沿って移動する複製バンドが生じる。それとは対照的に、最終的にメガ染色体の格子パターンを生じた複製ゾーンの拡大が認められ、複製期間中では、ほとんどの強力なBrdU取り込みがS期の後半で起こった。これは、メガレプリケーターが活性化されたら、それによって「二次」開始点の活性化および点火ができ、付随DNAの大部分の複製が、S期の後半でそれらの「二次」開始点から起こることを示唆するものである。これは、メガ染色体の複製のある種の段階で、アンプリコン全体が短いBrdUパルスによって見かけ上標識され得るという所見によって裏付けられる。

メガレプリケータおよび二次複製開始点は、厳格な時間的および空間的制御下にあると思われる。メガ染色体内の最初の開始は動原体で起こるのが普通であり、その後間もなくして、メガレプリケータ全てが活性となる。複製を完了するメガ染色体の最後の部分は、長腕の第2の部分であるのが普通であった。マウスA9染色体を用いた対照実験の結果からは、マウス染色体の異質染色質の複製が、メガ染色体アンプリコンの複製に相

当することが示される。従って、異質染色質ブロックにすでに存在する複製の時間的制御が、メガ染色体で保存されている。転写活動と複製開始との間の正の相関 [Hassan *et al.* (1994) *J. Cell. Sci.* 107:425-434] および負の相関 [Haase *et al.* (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:2516-2524] が提案されている。メガ染色体では、組込み遺伝子の転写は、複製開始点の元のタイミングに対して影響しないと思われる。異なるアンプリコンでのメガレプリケータ開始の統一的で正確なタイミングは、特異的でシス作用性の配列、複製起源の存在を示唆するものである。

マウス染色体の挟動原体異質染色質が、7~15 Mbの範囲の数千の短く簡単な反復単位を有し、動原体自体も数百のキロ塩基を有し得ることを考慮すると、高次の複製単位が存在する可能性が高いと思われる。メガ染色体の複製開始領域に制限された未制御染色体複製が認められたことは、ローリングサークル型増幅を強く示唆するものであり、この領域における複製開始点の存在に対する証拠を追加するものである。

特異的複製開始部位がアンプリコンの境界で生じるという所見は、複製が増幅プロセスで何らかの役割を果たす可能性のあることを示唆するものである。その結果は、メガ染色体の各ア

ンプリコンを、複製の「二次」開始点を有する一次開始部位 [メガレプリケータ] によって規定される巨大なメガレプリコンと見なすことができることを示唆するものである。メガレプリコン内における二方向性複製の異なる起源からの複製バブル (bubble) の融合 [DePamphilis (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:29-63] に

よって、メガレプリコン全体に相当する巨大な複製バブルが形成されることが考えられる。これを考慮すると、複製指向的な増幅機序によって、メガベースの大きさのアンプリコンを形成することができる。H型およびE型増幅では、アンプリコンの染色体内増加が認められ〔上記の実施例参照〕、それは不均一姉妹染色分体交換モデルと一致する。構成異質染色質におけるメガレプリコンの誘発もしくは自然の不定期複製によっても新たなアンプリコンが形成されて、それが増幅の拡大または「正常」染色体の異質染色質多形を生じる可能性がある。メガ染色体の長腕の失われた部分の「復旧」は、1本鎖に限定された1個のアンプリコンの再複製の結果であると考えられる。

これらを併せて考えると、理論は別として、複製指向機序によって、マウス染色体の動原体領域における大量複製開始とデノボ染色体形成に対して妥当な説明が得られる。特異的〔増幅

配列、すなわち増幅を制御する配列〕配列が増幅プロセスを促進する上で何らかの役割を果たす場合、メガレプリコンの一次複製開始部位〔メガレプリケータ〕での配列が候補として考えられる。

メガ染色体における外来DNA付近のアンプリコン境界におけるrRNA遺伝子配列の存在は、この配列が一次複製開始部位に寄与し、SATACのデノボ形成における挟動原体異質染色質の大量増幅に関与することを示唆するものである。リボソームRNA遺伝子は、縦列遺伝子の複数コピーを提供する固有の増幅機序を有する。そこで、本発明に関しては、細胞でのSATACの構築で、rDNAは標的組込みのための領域として、さらにはin vitroで構築されるSATACの成分として役立つ。

実施例9

マウス1番染色体由来の増幅領域を有する染色体の形成

実施例2～7に記載の事象がマウス7番染色体に固有のものではないこと、ならびに人工染色体形成にEC7/3細胞系が必要条件というわけではないことを示すため、異なる初期細胞系およびDNA断片を用いて実験を繰り返した。いかなる細胞または細胞系も使用が可能であるか、あるいは使用できないこ

とを容易に決定することができる。

A. 材料

5×10^6 個の受容体細胞についてプラスミドDNA $25 \mu\text{g}$ を用いて、「極き取り負荷」トランスフェクション法 [Fechheimer et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:8463-8467] によって、LP11細胞系を得た。LP11細胞を、 $3 \sim 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ のプロマイシン [SIGMA] を含むF-12培地で維持した。

B. LP11細胞での増幅

上記の実施例に記載の大量増幅は、形質転換EC3/7細胞系やマウスの7番染色体に限定されるものではない。独立の形質転換実験で、選択可能なプロマイシン耐性遺伝子を含む構築物でpPuroTelと称されるもの〔このプラスミドの記載については、実施例1. E. 2参照〕を用いたリン酸カルシウム沈殿法によって、LMTK⁻細胞をトランスフェクションして、細胞系LP11を得た。細胞系LP11は、異なった長さ〔約150~600Mb〕の増幅染色体部分のある染色体を有する。LP11細胞の細胞学的分析から、増幅は、ロバートソン (Robertsonian) 転座によって生成する次中部動原体染色体の

長腕の挟動原体領域で起こることが示された。この染色体腕は、G分染によって1番染色体であると確認された。C分染およびマウス主要付随DNAプローブとのin situハイブリダイゼーションは、E型増幅が起こっていることを示しており、新たに形成された領域は、異なる量の異質染色質を含む真正染色質染色体部分の配置から構成されていた。増幅部分の大きさおよびCバンドパターンは不均一であった。いくつかの細胞で、これら増幅単位の数はいくつを越えていた。しかしながら、LP11細胞系の単一細胞サブクローンは、10~15個の部分と一定のCバンドパターンを有する安定なマーカー染色体を有する。

LP11細胞の単一細胞クローニングによって得られたチミジンキナーゼ欠乏LP11細胞の亜細胞系 (例: LP11-15P 1C5/7細胞系) を、チミジンキナーゼ遺伝子構築物でトランスフェクションした。安定なTK⁺トランスフェクション体を得た。

実施例 10

異型塩基含有量および／または大きさによる SATAC および他の染色体の単離

1. 内因性染色体からの人工染色体の単離

SATAC などの人工染色体は、好適な方法を用いて内因性染色体から分けることができ、代表的には中期染色体の単離、人工染色体と内因性染色体との識別および人工染色体と内因性染色体との分離が関与する。そのような方法には通常、(1) 好ましくは 1×10^6 個程度で人工染色体を得ることができるだけの数の細胞（代表的には、約 2×10^7 個の有糸分裂細胞）を培養する段階、(2) コルヒチンなどの有糸分裂停止剤を用いて、有糸分裂の段階、好ましくは中期で、細胞の細胞周期を停止する段階、(3) 特には、細胞を低張緩衝液中で膨張させることで処理して、破壊に対する細胞の感受性を高める段階、(4) 放出された染色体を安定化させるための単離緩衝液の存在下に、物理的力を加えて細胞を破壊する段階、(5) 遊離染色体を安定化させるための単離緩衝液の存在下で染色体を分散させる段階、(6) 人工染色体と内因性染色体とを分離する段階、(7) 単離した染色体を適切な緩衝液中で保存する段階（および所望に応じて輸送する段階）という基本的段階がある。例えば、成長の特性および要件が異なる各種細胞型を扱い、停止剤による有糸分裂遮断の期間を至適化して染色体収量と残屑レベルの望ましい均衡を得るための人工染色体の一般的単離方法

の改良法および変法を経験的に決定することができる。

段階 1～5 は、中期染色体の単離に関係するものである。人工染色体と内因性染色体との分離（段階 6）は、各種方法で行うことができる。例えば、染色体は、ヘキスト 33258 およびクロモマイシン A₃ などの DNA 特異的染料で染色し、蛍光活性化細胞選別法（FACS）を行うことで、染料含有量に基づいて人工染色体と内因性染色体に選別した。人工染色体の大量単離を容易にするため、スイングバケット遠心（染色体の大きさおよび密度に基づいた分離を行うため）[Mendelsohn *et al.* (1968) *J. Mol. Biol.* 32:101-108 参照]、ゾーナルローター遠心（染色体の大きさおよび密度に基づいた分離を行うため）[例えば、Burki *e*

t al. (1973) Prep. Biochem. 3:157-182; Stubblefield et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 83:1404-1414参照]、速度沈降(染色体の大きさおよび形状に基づいた分離を行うため)[例えば、Collard et al. (1984) Cytometry 5:9-19参照]などの各種分離方法を用いることができる。免疫親和性精製法も、大量人工染色体単離法で用いることができる。その方法では、人工染色体を含む細胞(非同期または有糸分裂豊富)の大きい群をまとめて回収し、固体状態基体(例: カラム樹脂

または磁気ビーズなど)に結合した抗体に結合させることで、有糸分裂染色体(低張緩衝液中での細胞のインキュベーションおよび/または処理した細胞の物理的破壊と併用した細胞の洗剤処理などの標準的方法を用いて、細胞から放出させることができる)が豊富となる。この方法での使用に好適な抗体を、凝集動原体蛋白または凝集およびDNA結合ヒストン蛋白に結合させる。例えば、哺乳動物動原体を認識する自己抗体LU851 (Hadlaczky et al. (1989) Chromosoma 97:282-288参照)を用いて染色体の大量単離を行ってから、FACSなどの方法を用いて内因性染色体から人工染色体を分離することができる。結合した染色体を洗浄し、最終的に溶離して選別することになる。免疫親和性精製法を用いて、人工染色体を内因性染色体と直接分離することもできる。例えば、ハムスター細胞(例: V79細胞もしくはCHO-K1細胞)などの比較的少量の異質染色質を含む染色体を有する細胞系でSATACを形成することができるか、あるいはその細胞系にSATACをトランスフェクションすることができる(例: 本明細書に記載のような微量注入または微小核体融合によって)。次に、固体基体に接合した抗異質染色質結合蛋白(ショウジョウバエHP-1)抗

体を利用することで、主として異質染色質であるSATACを内因性染色体から分離する。そのような基体は、ハムスター染色体と比較してSATACと優先的に結合する。未結合のハムスター染色体を基体から洗い出し、SATACを標準法によって溶離する。

A. 細胞系および細胞培養手順

ある単離方法では、メガ染色体または切断メガ染色体を有する1B3マウス-ハムスター-ヒトハイブリッド細胞〔図4参照〕を、10%ウシ胎仔血清、150 μ g/mLハイグロマイシンBおよび400 μ g/mL G418を補給したF-12培地で増殖させた。メガ染色体およびミニ染色体を有するGHB42〔G3D5細胞から再クローニングした細胞系〕マウス-ハムスターハイブリッド細胞も、10%ウシ胎仔血清、150 μ g/mLハイグロマイシンBおよび400 μ g/mL G418を含むF-12培地で培養した。両方の細胞系の倍化時間は約24~40時間、代表的には約32時間であった。

代表的には、細胞単層が約60~80%の集密度に達した時に継代培養し、48~72時間ごとに分けた。80%を超える集密度に達した細胞は培養で老化しており、染色体回収には好

ましくない。細胞を、約50~70%集密度で12~30時間にわたって100~200個の100mLシャーレ中で平板培養してから、有糸分裂停止を行うことができる(下記参照)。

人工染色体のための宿主として使用することができ、人工染色体を単離することができる他の細胞系には、PtK1(NBL-3)有袋動物腎臓細胞(ATCC受託番号CCL35)、CHO-K1チャイニーズハムスター卵巣細胞(ATCC受託番号CCL61)、V79-4チャイニーズハムスター肺細胞(ATCC受託番号CCL93)、インドムンチャク(Indianmuntjac)皮膚細胞(ATCC受託番号CCL157)、LMTK(-)チミジンキナーゼ欠乏マウスL細胞(ATCC受託番号CCL1.3)、Sf9行列毛虫ヨトウガ(fall armyworm)(*Spodoptera frugiperda*)卵巣細胞(ATCC受託番号CRL1711)ならびにMAC、特にSATACを構築するのに使用することができる、例えば本明細書に記載のハムスター-マウスハイブリッド細胞などの形成ヘテロカリオン(ハイブリッド)細胞系などがあるが、これらに限定されるものではない。

細胞系を選択して、例えば大量生産プロセスで望まれるような人工染色体の生産および単離の効率を高めることができる。

例えば、宿主細胞選択における考慮事項の一つとしては、細胞の人工染色体／総染色体比があり得る。人工染色体と内因性染色体との分離を容易にするため、人工染色体／総染色体比は高い方が望ましいと考えられる。例えばH1D3細胞（マウス／ハムスターヘテロカリオン；図4参照）の場合、この比は1：50、すなわち総染色体50個に対して人工染色体（メガ染色体）1個である。それとは対照的に、インドムンチャク皮膚細胞（ATCC受託番号CCL157）は、染色体総数（7本の染色体の二倍数）が相対的に少なく、同様にカンガルーネズミ細胞（12本の染色体の二倍数）でも、細胞での人工染色体の導入または形成時における人工染色体／総染色体比が相対的に高いと考えられる。

人工染色体の生産および単離について宿主細胞を選択する上での別の考慮事項としては、人工染色体の大きさと比較した内因性染色体の大きさがあると考えられる。染色体の大きさの差を利用して、人工染色体と内因性染色体との分離を容易にすることができる。例えば、インドムンチャク皮膚細胞染色体は、ミニ染色体や切断メガ染色体よりかなり大きいことから、人工染色体とムンチャク染色体との分離は、一変量（1個の染料、

ヘキスト33258またはクロモイシンA3）FACS分離法を用いて行うことができると考えられる。

人工染色体の生産および単離のための宿主細胞を選択する上での別の考慮事項としては、細胞の倍化時間があり得る。例えば、人工染色体を単離する手順で使用するのに十分な数の人工染色体含有細胞を形成するのに必要な時間は、大量生産にとっては重要であると考えられる。そこで、倍化時間が相対的に短い宿主細胞が望ましいと考えられる。例えば、V79ハムスター肺細胞の倍化時間は約9～10時間であるのに対してH1D3細胞の倍化時間は約32時間である。

従って、いくつかの点について考慮して、人工染色体の生産および単離のための宿主細胞選択を行うことができる。人工染色体のデノボ形成に最も望ましいとして選択される宿主細胞は、細胞系で形成される人工染色体の大量生産向けに至適化されていない場合がある。そのような場合、最初の宿主細胞系で人工染色体を形成したら、人工染色体の有効で高レベルな生産および単離に比較的好適な産

生細胞系にそれを転移させることが可能であると考えられる。そのような転移は、例えば本明細書に記載のような微小核体融合または本明細書に記載のような手順

を用いる形成細胞系から精製した人工染色体の生産細胞系への微量注入などのいくつかの方法によって行うことができる。生産細胞系は好ましくは、細胞当たり2個以上の人工染色体コピーを有するものとする。

B. 染色体単離

一般に、細胞は級数的成長で2世代にわたって培養してから、有糸分裂停止を行うのが普通である。ある特定の単離法で有糸分裂1B3およびGHB42細胞を蓄積するため、5 μ g/mL コルヒチンを培地に12時間加えた。得られた有糸分裂指数は60~80%であった。有糸分裂細胞を、単層細胞での培地の慎重なピペット採取による選択的分離によって回収した。集めた（有糸分裂）細胞を平板から放出させる手段として、機械的振り落としを利用することも可能である。200 \times gで10分間の遠心によって、細胞を沈降させた。

細胞（プラスチック上または懸濁液で成長）は、ヒドロキシ尿素、ビンブラスチン、コルセミドまたはアフィジコリンなどのコルヒチン以外の化学薬剤によって、細胞周期の各種段階で停止させることができる。ヒドロキシ尿素およびアフィジコリンなどの有糸分裂以外の段階に細胞を停止させる化学薬剤を用

いて、その群における全ての細胞の周期を同期させてから、細胞培地から取り出して、細胞をほぼ同時に有糸分裂まで進めて、その時点で細胞を回収して、染色体を分散させることができる。有糸分裂細胞を豊富として、機械的振り落とし（付着細胞）に供することができると考えられる。MAC含有細胞の群内での細胞の細胞周期を、養分、成長因子またはホルモン遮断によって同期させて、G₁またはG₀段階の細胞を蓄積することもできる。次に、養分または成長因子を再度加えることで、静止細胞を約1世代において同期された細胞周期に再度入らせることができる。このようにしてホルモン遮断に対して反応することが知られていて、人工染色体のための宿主として好適である細胞系には、増殖刺激をプロラク

チンに全面的に依存しているNb2ラットリンパ腫細胞系などがある (Gout et al. (1980) Cancer Res. 40:2433-2436参照)。細胞をプロラクチン欠乏培地で18~24時間培養することで増殖を停止し、細胞を細胞周期のG₁期初期で蓄積する。プロラクチンを加えると、90%を超える細胞が有糸分裂状態にあると考えられるM期まで、全ての細胞がその細胞周期を進む (コルヒチンを加えることで、有糸分裂細胞の量を95%超とすることができると考えられる)。プロ

ラクチン添加による増殖の再開と染色体分離のための有糸分裂細胞回収の間の時間は経験的に決定することができる。

別法として、V79細胞などの付着細胞を、ローラーボトルで増殖させ、ローラーボトルを200rpm超で回転させることで、有糸分裂細胞をプラスチック表面から放出させる (Shwarchuk et al. (1993) Int. J. Radiat. Biol. 64: 601-612)。ある所定の時点で、級数的に成長する同期群中の細胞の約1%がM期となる。コルヒチンを加えない場合であっても、200rpmでの5分間の遠心によって、4個の1750cm²ローラーボトルから2×10⁷個の有糸分裂細胞が回収されている。コルヒチンを2時間加えることで、収量を6×10⁸個の細胞まで上昇させることができる。

いくつかの方法を用いて、これらの細胞から中期染色体を単離することができ、その方法には、ポリアミン緩衝液系に基づくもの [Cram et al. (1990) Methods in Cell Biology 33:377-382]、修正ヘキシレングリコール緩衝液系に基づくもの [Hadlaczky et al. (1982) Chromosoma 86:643-65]、硫酸マグネシウム緩衝液系に基づくもの [Van den Engh et al. (1988) Cytometry 9:266-270 およびVan den Engh et al. (1984)

Cytometry 5:108]、酢酸固定緩衝液系に基づくもの [Stoehr et al. (1982) Histochemistry 74:57-61] ならびに低張KClおよびヨウ化プロビジウムを利用する方法に基づくもの [Cram et al. (1994) XVII meeting of the International Society for Analytical Cytology, October 16-21, Tutorial IV Chromosome Analysis and Sorting with Commercial Flow Cytometers; Cram et al. (199

0) Methods in Cell Biology 33: 376] などがあるが、これらに限定されるものではない。

1. ポリアミン法

1 B 3 または G H B 4 2 細胞から人工染色体を単離するのに使用したポリアミン法では、約 10^7 個の有糸分裂細胞を低張緩衝液 (7.5 mM KCl, 0.2 mM スペルミン, 0.5 mM スペルミジン) 10 mL 中で室温にて 10 分間インキュベーションすることで、細胞を膨張させた。細胞は低張緩衝液中で膨張して、中期染色体を放出するが、細胞溶解には至らない。次に細胞を、代表的には室温で、 $100 \times g$ で 8 分間遠心した。細胞ペレットを注意深く取り出し、約 10^7 個の細胞をポリアミン緩衝液 [1.5 mM トリス-HCl, 20 mM NaCl, 80 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA,

1.4 mM β -メルカプトエタノール, 0.1% ジギトニン, 0.2 mM スペルミン, 0.5 mM スペルミジン] 1 mL に再懸濁させて、中期染色体を物理的に分散させた。次に、細胞懸濁液を慎重に抜き取り、それを 3 mL プラスチック注射器に取り付けた 22 G 針から排出することで、染色体を放出させた。染色体濃度は、染色体約 $1 \sim 3 \times 10^8$ 個/mL であった。

ポリアミン緩衝液単離プロトコールは、高分子量染色体 DNA を得るのに好適である [Sillar and Young (1981) J. Histochem. Cytochem. 29:74-78; VanDilla et al. (1986) Biotechnology 4:537-552; Bartholdi et al. (1988) In "Molecular Genetics of Mammalian Cells" (M. Goettsman, ed.), Methods in Enzymology 151:252-267. Academic Press, Orlando]。染色体安定化緩衝液は、ポリアミンであるスペルミンおよびスペルミジンを用いて、染色体構造を安定化させ [Blumenthal et al. (1979) J. Cell Biol. 81:255-259; Lalande et al. (1985) Cancer Genet. Cytogenet. 23:151-157]、重金属キレート化剤を用いてヌクレアーゼ活性を低下させるものである。

しかしながらポリアミン緩衝液プロトコールは、他のプロト

コールの場合同様に広い適用範囲を持ち、遮断時間、細胞濃度、低張膨張緩衝液

の種類、膨張時間、低張緩衝液の容量、および渦攪拌時間という変量を各細胞種について至適化しなければならない。このプロトコールを用いて製造される染色体は非常に凝縮しているのが普通である。

細胞を膨張させるのに使用できるいくつかの低張緩衝液があり、その例としては、7.5 mM KCl; 7.5 mM KCl、0.2 mM スペルミン、0.5 mM スペルミジン; 16.2 mM 亜硝酸ナトリウム、6.5 mM 酢酸ナトリウム、32.4 mM KCl のオーヌキ (Ohnuki) の緩衝液 [Ohnuki (1965) *Nature* 208:916-917 および Ohnuki (1968) *Chromosoma* 25:402-428] ならびにさらに 0.2 mM スペルミンおよび 0.5 mM スペルミジンを含むオーヌキの緩衝液の変種などがある。加える緩衝液の量および低張性は、細胞の種類および細胞濃度によって変動する。量は細胞 10^7 個当たり 2.5 ~ 5.5 mL の範囲またはそれ以上とすることができる。膨張時間は 10 ~ 90 分で変動させることができ、細胞の種類およびどの膨張緩衝液を使用するかで決まる。

ポリアミン単離緩衝液の組成も変動し得る。例えば、ある修

正緩衝液では、15 mM トリス-HCl (pH 7.2)、70 mM NaCl、80 mM KCl、2 mM EDTA、0.5 mM EGTA、14 mM β -メルカプトエタノール、0.25% トリトン-X、0.2 mM スペルミンおよび 0.5 mM スペルミジンを含む。

染色体分散は、各種物理的手段によって行うこともできる。例えば、細胞懸濁液を慎重に抜き取り、22 ゲージ針を取り付けた 3 mL 注射器に排出することができ [Cram et al. (1990) *Methods in Cell Biology* 33:377-382] ; 細胞懸濁液は卓上渦攪拌機で攪拌することができ [Cram et al. (1990) *Methods in Cell Biology* 33:377-382] ; 細胞懸濁液は、ホモジナイザーによって破壊することができ [Sillar and Young (1981) *J. Histochem. Cytochem.* 29:74-78; Carrano et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:1382-1384] ; 細胞懸濁液は卓上超音波浴で破壊することができる [Stoehr et al. (1982) *Histochemistry* 74:57-61] 。

2. ヘキシレングリコール緩衝液系

1 B 3 また G H B 4 2 細胞から人工染色体を単離するのに用いたヘキシレングリコール緩衝液法では、約 8×10^6 個の有

糸分裂細胞を、グリシン-ヘキシレングリコール緩衝液 [100 mM グリシン、1% ヘキシレングリコール、飽和水酸化カリウム溶液で pH 8.4~8.6 に調節] 10 mL に再懸濁させ、37℃ で 10 分間インキュベーションし、次に 10 分間遠心することで、核をペレット化した。上清を再度、200 × g で 20 分間遠心して、染色体をペレットとした。染色体を単離緩衝液中に再懸濁させた (染色体 $1 \sim 3 \times 10^8$ 個/mL)。

ヘキシレングリコール緩衝液組成も変更可能である。例えば、ある修正緩衝液では、25 mM トリス-HCl (pH 7.2)、750 mM ヘキシレングリコール、0.5 mM CaCl_2 、1.0 mM MgCl_2 を含有させる [Carrano *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:1382-1384]。

3. 硫酸マグネシウム緩衝液系

この緩衝液系は、ポリアミンおよびヘキシレングリコール緩衝液系との関連で上述したような細胞膨張法および染色体分散法のいずれにおいても使用することができる。この方法では、有糸分裂細胞を、4.8 mM HEPES (pH 8.0)、9.8 mM MgSO_4 、4.8 mM KCl、2.9 mM ジチオトレイトールからなる緩衝液に再懸濁させる [Van den Engh *et al.*

(1985) *Cytometry* 6:92 および Van den Engh *et al.* (1984) *Cytometry* 5: 108]。

4. 酢酸固定緩衝液系

この緩衝液系は、ポリアミンおよびヘキシレングリコール緩衝液系との関連で上述したような細胞膨張法および染色体分散法のいずれにおいても使用することができる。この方法では、有糸分裂細胞を、25 mM トリス-HCl (pH 3.2)、750 mM (1, 6)-ヘキサンジオール、0.5 mM CaCl_2 、1.0% 酢酸からなる緩衝液に再懸濁させる [Stoeckert *et al.* (1982) *Histochemistry* 74:57-61]。

5. KCl-ヨウ化プロピジウム緩衝液系

この緩衝液系は、ポリアミンおよびヘキシレングリコール緩衝液系との関連で上述したような細胞膨張法および染色体分散法のいずれにおいても使用することができる。この方法では、有糸分裂細胞を、25 mM KCl、50 μ g/mL ヨウ化プロピジウム、0.33% トリトンX-100、333 μ g/mL RNase からなる緩衝液に再懸濁させる [Cram et al. (1990) *Methods in Cell Biology* 33:376]。

蛍光染料ヨウ化プロピジウムを用いるが、これは染色体安定

化剤としても役立つ。顕微鏡のスライドグラス上に懸濁液の小滴を乗せ、位相差顕微鏡／蛍光顕微鏡によって細胞を観察することで、低張媒体（これもヨウ化プロピジウムを含むことができる）中での細胞の膨張をモニタリングすることができる。細胞は膨張しながらヨウ化プロピジウムを排除するはずであるが、一部は早期に溶解して、染色体蛍光を示す。細胞を遠心し、KCl-ヨウ化プロピジウム緩衝液系に再懸濁させた後、その細胞は、緩衝液中に洗剤が存在するために溶解する。次に、染色体を分散させてから、37℃にて30分以下でインキュベーションして、RNaseを活性化させることができる。次に、染色体取得物をフローサイトメーターによって分析する。ヨウ化プロピジウムの蛍光を、アルゴンレーザの488 nm波長で励起させ、1個の光電子増倍管によってOG570光ファイバーを介して検出することができる。一変量ヒストグラムで、単一パルスを、統合・獲得することができる。小さい（直径1.5 μ m）ミクロスフェアを用いて、流動細胞計測法を2%以下のCVに配置することができる。染色体取得物を60 μ mナイロンメッシュで濾過して、分析に供する。

C. DNA特異的染料による染色体の染色

単離後、染色体取得物を6 μ g/mLのヘキスト33258および200 μ g/mLのクロモマイシンA3で染色した。分析の15分前に、25 mMの亜硫酸ナトリウムおよび10 mMのクエン酸ナトリウムを染色体懸濁液に加えた。

D. 染色体の流動選別

1 B 3 および G H B 4 2 細胞から得られ維持された染色体を、ポリアミンに基づくシース (sheath) 緩衝液 (0.5 mM EGT A、2.0 mM EDT A、80 mM KC l、70 mM Na C l、15 mM トリス-HC l (p H 7.2)、0.2 mM スペルミンおよび0.5 mM スペルミジン) に懸濁させた [Sillar and Young (1981) *J. Histochem. Cytochem.* 29:74-78]。次に染色体を、2 個のレーザが染色体を別個に励起して、大きさと塩基対組成によって染色体の二変量解析ができるようになっている二重レーザセルソーター [FACStar PlusまたはFAXStar Vantage Becton Dickinson Immunocytometry System; Coulter Electronic s 製造のもの (Elite ESP) およびCytomation製造のもの (MoFlo) などの他の二重レーザ選別機も使用可能である] に通した。SATAC と他の染色体の塩基組成の差と結果

的に生じる染料との相互作用における差、ならびに大きさの差があることから、SATAC は他の染色体と分離された。

E. 選別した人工染色体の保存

選別した染色体を遠心によってペレットとし、各種緩衝液中に懸濁させ、4℃で保存した。例えば、単離した人工染色体をGH緩衝液 (100 mM グリシン、1% ヘキシレングリコール (飽和水酸化カルシウム溶液で p H 8.4~8.6 に調節したもの) [例えば、Hadiaczky et al. (1982) *Chromosoma* 86:643-659 参照] 中で1日間保存して、遠心によってアガロースに包埋することができる。選別された染色体を遠心してアガロース床に入れ、固形物を500 mM EDT A 中4℃で保存する。別の保存緩衝液には、CMB-1/ポリアミン緩衝液 (17.5 mM トリス-HC l (p H 7.4)、1.1 mM EDT A、50 mM ϵ -アミノカプロン酸、5 mM ベンズアミドHC l、0.40 mM スペルミン、1.0 mM スペルミジン、0.25 mM EGT A、40 mM KC l、35 mM Na C l) ならびにCMB-11/ポリアミン緩衝液 (100 mM グリシン (p H 7.5)、78 mM ヘキシレングリコール、0.1 mM EDT A、50 mM ϵ -アミノカプロン酸、5 mM ベンズアミド-HC l、

0.40 mM スペルミン、1.0 mM スペルミジン、0.25 mM EGTA、40 mM KCl、35 mM NaCl) などがある。

微量注入が所期の用途である場合、選別した染色体を30%グリセリンで-20℃にて保存する。選別した染色体は、短い期間であれば(3~6日間)、グリセリンを用いずに保存緩衝液中4℃で保存することもできる。微量注入用の緩衝液の例としては、CBM-I (10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、50 mM ϵ -アミノカプロン酸、5 mM ベンズアミドHCl、0.30 mM スペルミン、0.75 mM スペルミジン)、CBM-II (100 mM グリシン (pH 7.5)、78 mM ヘキシレングリコール、0.1 mM EDTA、50 mM ϵ -アミノカプロン酸、5 mM ベンズアミド-HCl、0.30 mM スペルミン、0.75 mM スペルミジン) などがある。

分離染色体の長期保存には、上記の緩衝液に50%グリセロールを加え、-20℃で保存するのが好ましい。

F. 品質管理

1. 純度分析

選別された染色体の純度を、ビオチン標識マウス付随DNA

プローブによる蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)によって調べた [Hadlaczky et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:8106-8110参照]。単離染色体の純度は約97~99%であった。

2. 選別染色体の特性

パルスフィールドゲル電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションを行って、選別された人工染色体のDNA含有量の大きさ分布を求めた。

G. 純粋人工染色体の機能性

これら染色体の活性が保存されているか否かを調べるため、純粋な人工染色体を、初代培養細胞、体細胞および幹細胞に微量注入し(実施例13に記載のような方法によって)、次にそれについて、選択培地での増殖に関する分析および β -ガラクトシダーゼ活性のアッセイなどの人工染色体が有する異種遺伝子の発現を分析する。

11. 哺乳動物人工染色体を含む微小核体の分離

A. 小核化

細胞を、4 T 1 5 0 フラスコ中で、8 0 ~ 9 0 % 集密度となるまで増殖させた。コルセミドを、最終濃度 0 . 0 6 μ g /

m L となるまで加え、次に 3 7 $^{\circ}$ C で細胞と 2 4 時間インキュベーションした。

B. 核抽出

1 0 μ g / m L のサイトカラシン B を加え、得られた微小核体を 2 8 ~ 3 3 $^{\circ}$ C で 1 5 0 0 0 r p m にて 7 0 分間遠心した。

C. 濾過による微小核体の精製

スイネックス (Swinnex) フィルターユニットおよびヌクレオポア (Nucleopore) フィルター [5 μ m および 3 μ m] を用いて、微小核体を精製した。

D. 微小核体の染色および選別

上述のように、細胞をヘキストおよびクロモマイシン A 3 染料を用いて染色した。微小核体は、セルソーターによって選別し、哺乳動物人工染色体を含む微小核体を単離した。

E. 融合

人工染色体を含む微小核体を、例えば実施例 1 . A . 5 に記載の方法に従って、所定の初代培養細胞、体細胞、胚幹細胞に融合させて、遺伝子導入 (人間以外) 動物を形成して遺伝子療法に用いたり、他の細胞に融合させてその染色体を細胞に導入する。

実施例 11

哺乳動物人工染色体の昆虫細胞への導入

昆虫細胞は、MAC 用、特に遺伝子産生物の生産で使用するのに有用な宿主であるが、それには以下のような多くの理由がある。

1 . 哺乳動物人工染色体は、対象の蛋白をコードする遺伝子導入のためのゲノム外特異的組み込み部位を提供する [生産系での突然変異の確率低下] 。

2 . 人工染色体が大きいと、メガ塩基の大きさの DNA 組み込みが可能となり

、蛋白またはアルカロイド〔ジギタリス、モルヒネ、タキソール〕などの治療的価値のある非蛋白を生じる経路全体をコードする遺伝子を人工染色体に持たせることができる。

3. 有用な蛋白をコードする遺伝子の増幅を、人工哺乳動物染色体で行って、昆虫細胞での蛋白収量を上昇させることができる。

4. 昆虫細胞は、蛋白の生理機能に必須の必要な翻訳後修飾（糖付加、リン酸化）を支持する。

5. 昆虫細胞は、哺乳動物ウィルスを支持せず、ヒト感染因

子による生成物の交差汚染が起こらない。

6. 染色体を導入する能力は、昆虫細胞系における栄養用、工業用または医療用蛋白の生産に向けた従来の組換えバキュロウィルス系より優れている。

7. 昆虫細胞成長に最適な低い温度（28℃）により、生産のエネルギーコストを下げるができる。

8. 昆虫細胞用の血清を含まない成長培地により、生産コストが低くなる。

9. 人工染色体を含む細胞は、低温で無期限に保存することができる。

10. 昆虫の幼虫は、受精昆虫卵の微量注入によって、栄養用蛋白、医療用蛋白または工業用蛋白の生産のための生物工場として役立つ。

A. 昆虫細胞による哺乳動物プロモーターの認識

検出可能なマーカー遺伝子〔Renillaルシフェラーゼ遺伝子（RenillaルシフェラーゼをコードするDNAならびにそのようなベクターの構築のための原料を提供し得るプラスミドpTZrluc-1の説明については、例えば米国特許5292658号参照。さらに、配列番号10も参照）〕に連結されたC

MVプロモーターや、さらにはβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に機能的に連結されたサルウィルス40（SV40）プロモーターなどの哺乳動物プロモータを有する遺伝子構築物を、2種類の動物Trichoplusia ni〔イラクサキンウワバ〕およびBombyx mori〔カイコ〕の細胞に導入した。

エレクトロポレーションまたは微量注入によって昆虫細胞を構築物に転移させ



た後、24時間のインキュベーション後に、マーカー遺伝子の発現をルシフェラーゼアッセイ（例えば、実施例12. C. 3）およびβ-ガラクトシダーゼアッセイ（lacZ染色アッセイなど）によって検出した。これら遺伝子を含まないサンプルに対し、遺伝子を有するサンプルでのみ、陽性の結果が得られた。さらに、B. mori β-アクチンプロモーターRenillaルシフェラーゼ遺伝子融合体を、T. niおよびB. mori細胞に導入したところ、トランスフェクション後にこれらは発光した。すなわち、ある種の哺乳動物プロモーターは、昆虫細胞でのこれらマーカー遺伝子を直接発現させるように機能する。従って、MACは昆虫細胞における異種遺伝子の発現の候補である。

B. 昆虫細胞で使用するためのベクターの構築および哺乳動物細胞との融合

1. 発現ベクターを有するLMTK⁺細胞を下記のもので形質転換する。
 - a. B. mori β-アクチンプロモーター昆虫細胞におけるHyg^r選択可能マーカー遺伝子
 - b. 哺乳動物細胞におけるプロマイシン^r選択可能マーカー遺伝子を制御するSV40またはCMVプロモーター。
2. LMTK細胞（プロマイシン^r LMTK細胞）で哺乳動物プロモータの発現を検出する。
3. Bombyx細胞およびTrichoplusia細胞との融合実験でプロマイシン^r細胞を用い、Hyg^r細胞を選別する。

C. 昆虫細胞へのMACの挿入

これらの実験は、昆虫細胞に導入されたMACにある検出可能マーカー遺伝子[pSV40などの哺乳動物プロモータの制御下に発現されるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子など]を検出するためのものである。データは、β-galが発現されたことを示している。

例えばミニ染色体[EC3/7C5]もしくはミニおよびメ

ガ染色体[G3D5から再クローニングされる細胞系であるGHB42など]の哺乳動物人工染色体を有する哺乳動物細胞あるいはメガ染色体[H1D3または

その再クローニング体など]のみを有する細胞系と、昆虫細胞を融合させる。融合は次のように行う。

1. 対数増殖期にある哺乳動物と昆虫細胞を混合する (50%/50%)。
2. カルシウム/PEG細胞融合: (10分間~0.5時間)
3. ヘテロカリオン (+72時間) を選別する。

MACを含む昆虫細胞について選別を行う以下の選別条件を用いることができる [+=陽性選別、-=陰性選別]。

1. 28℃での成長 (+昆虫細胞、-哺乳動物細胞) ;
2. グレース (Graces) 昆虫細胞培地 [SIGMA] (-哺乳動物細胞)
3. 外因性CO₂がないこと (-哺乳動物細胞) および/または
4. 抗生物質選択 (HygまたはG418) (+形質転換昆虫細胞)

融合プロトコルの直後に、哺乳動物と各昆虫細胞の間に多

くのヘテロカリオン [融合事象] が認められる [90%以下のヘテロカリオン]。形質転換哺乳動物細胞の選別に使用される選別レベルでG418および/またはハイグロマイシンを含む昆虫培地での増殖 [2週間以上] 後、個々のコロニーについて、融合平板での増殖を検出する。MACによって与えられる抗生物質耐性の選択および昆虫細胞の選択によって、これらのコロニーはMACを有するはずである。

B. mori β -アクチン遺伝子プロモータは、B. mori細胞および哺乳動物細胞 (例: EC3/7C5細胞) 中で β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を指向することが明らかになっている。そこで、プロモータに連結されたマーカー遺伝子の存在を哺乳動物細胞系および得られる昆虫細胞系で測定できることから、B. mori β -アクチン遺伝子プロモータは、後に昆虫細胞に転移される哺乳動物細胞で形成されるMACに入れるのに特に有用である。

実施例 12

染色体断片化用ベクター及びMACにDNAをターゲット化組込みするために用いられるその他のベクターの調製

メガ染色体の断片化によって最終的には、ベクターとして使



用するために操作し易いサイズである約15Mb~50Mbに短縮された安定な染色体が得られる。このような断片化用ベクターはまた、*in vitro*産生される人工染色体の調製に必要な要素を容易に決定及び同定するために使用できる。

異なる多くの方法によってメガ染色体のサイズを短縮し得る。このような短縮方法としては例えば、貧栄養化または低温処理もしくは熱処理などのストレス処理、BrdU、クマリン、EMSなどのゲノムを不安定化するもしくはDNAに切れ目を入れる物質による処理、イオン化放射線による処理（例えば、Brown (1992) *Curr. Opin. Genes Dev.* 2:479-486 参照）、テロメア特異的 *in vivo* 染色体断片化（例えば、Farrら (1995) *EMBO J.* 14:5444-5454 参照）などがある。

A. 人工染色体断片化のため及び選択された遺伝子産物のターゲット化組込みのために用いるベクターの調製

1. pTEMPUDの構築

プラスミドpTEMPUD（図5参照）は、*in vivo* 染色体断片化を行うため及び部位特異的組込みによって大規模増幅を誘発するために用いられるマウス相同組換え“キラー”

ベクターである。図5を参照すると、~3,625bpのSalI-PstIフラグメントはpBabe-puroレトロウイルスベクターから得られた（Morgensternら (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:3587-3596 参照）。このフラグメントは、アンピシリン耐性をコードするDNAと、pUC複製起点と、SV40初期プロモーターのコントロール下のピューロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子とを含む。URA3遺伝子部分はpYAC5クローニングベクター（SIGMA）に由来する。URA3をSalI-XhoI消化によってpYAC5から切出し、pNEB1.93（New England Biolabs）にクローニングし、次いでEcoRI-SalIで切断し、pBabepuroのSalI部位に結合させてpPUを作製した。

マウスの主要サテライトをコードする1293bpのフラグメント（配列1参照）を、マウスLMTK-線維芽細胞から調製したDNAライブラリーからEcoRIフラグメントとして単離し、pPUのEcoRI部位に挿入してpMPUを作製した。

TKプロモーターに駆動されるジフテリア毒素遺伝子（DT-A）を、pMC1DT-A（Maxwellら（1986）Cancer Res. 46:4660-4666参照）のBglII-XhoI消化によって誘導し、ネオマイシン耐性遺伝子をコードする配列を置換することによってpMC1neoポリA発現ベクター（STRATAGENE, La Jolla, CA）にクローニングした。TKプロモーター、DT-A遺伝子及びポリA配列をこのベクターから除去し、付着末端をクレノウで埋め戻し、得られたフラグメントの平滑末端を結合させ、pMPUのSnaBI（TACGTA）に結合させてpMPUDを作製した。

Hutelの2.5kbのフラグメント（配列3参照）をpMPUDのPstI部位に挿入し（pTEMPUDの6100PstI-3625pstIフラグメント参照）、pTEMPUDを作製した。このフラグメントは、ヒトのテロメアを含んでいる。このフラグメントは、非反復BglII部位（配列3のヌクレオチド1042-1047参照）を含み、BamHIオーバーハングはBglII部位と適合性なので、この非反復BglII部位は合成テロメアの導入部位として使用される。

合成テロメアは、非反復に維持されているBglII部位に挿入するためのBamHI末端及びBglII末端を備えた配列TTAGGGの多数（80）の反復を含む。BamHIフラグメントがBglII結合すると、BglII部位が破壊され、単一のBglII部位が残存する。非反復BglII部位を選択することによって合成テロメアの正しい方向の挿入が確保される。非反復BglII部位でベクターは直鎖化されている。

配列TTAGGGの多数の反復から成る合成テロメアを作製するために、この

0) の部分的に相補的な短いオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドをゲル精製し、アニーリングし、クレノウポリメラーゼで修復し、EcoRI 及びPstIで消化した。得られたEcoRI/PstIフラグメントを、EcoRI/PstI消化したpUC19に結合させた。得られたプラスミドを使用して大腸菌DH5 α コンピテント細胞を形質転換させ、LB/アンピシリン選択に生き残った形質転換体の1つに由来のプラスミドDNA (pTel102) をPacIで消化し、クレノウ及びdNTPで平滑末端を形成し、HindIIIで消化した。得られた2.7 kbのフラグメントをゲル精製した。

同時に、伸長したより遠位の26量体のM13配列決定プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって同じプラスミドを増幅させた。増幅産物をSmaI及びHindIIIで消化し、60bpのテロメア反復配列(と24bpのリンカー配列と)を含む84bpの二重鎖フラグメントを6%の生ポリアタリルアミドゲルで単離し、二重消化したpTel102に結合

させて120bpのテロメア配列を作製した。このプラスミドを用いてDH5 α 細胞を形質転換させた。得られた組換え体のうち、アンピシリン(100 μ g/ml)選択に生き残った2つの組換え体に由来のプラスミドDNAをABI DNAシーケンサーで色素ターミネーション法によって配列決定した。pTel29と命名された一方のプラスミドは、配列TTAGGGの20個の反復を含む(即ち、配列TTAGGGの連続する19個の反復と反復全鎖の各末端に結合した1/2配列とから成る)。pTel28と命名された他方のプラスミドは、本質的には配列TTAGGGの10個の反復を各々が含む2つの配列が結合し、この結合部で2bp(TA)が欠失したプラスミドである。この結果として、pTel28は接合部にモチーフGGGTGGGを有している。この突然変異はテロメア特異的染色体断片化の実験のタグとして役立つ。従って、普通よりも幾分長くポリリンカーから遠い配列、例えば配列:

5'-GCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGT-3' (配列31) の使用、または、いくつかの実験では、

m13順方向プライマーとして配列:

5' -GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA

C-3' (配列32)、逆方向プライマーとして配列:

5' -TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT-3' (配列33)の使用に基づくpUC/M13配列決定プライマーを用いたPCRによってpTel29インサートを増幅させた。

増幅産物をSmaI及びHindIIIで消化した。得られた144bpのフラグメントを6%の生ポリアクリルアミドゲルでゲル精製し、PacIで消化し、クレノウ及びdNTPで平滑末端を形成し、HindIII消化によってリンカーを除去しておいたpTel28に結合させた。この結合によって得られたプラスミドをpTel2801と命名した。プラスミドpTel2801は、配列TTAGGGの40個の反復から成り、1つの配列(即ち30番目の配列)の2個のヌクレオチド(TA)が欠失して配列TGGGとなっているテロメア配列を含む。

次の伸長段階では、pTel2801をSmaI及びHindIIIで消化し、264bpのインサートフラグメントをゲル精製し、PacIで消化し、平滑末端を形成し、HindIIIで消化しておいたpTel2801に結合させた。得られ

たプラスミドでDH5α細胞を形質転換させ、得られた形質転換体のうちアンピシリン選択に生き残った12の形質転換体に由来のプラスミドDNAを制限酵素分析によって試験して、0.5kbのEcoRI/pstIインサートフラグメントの有無を判定した。11個の組換え体が、予想された0.5kbのインサートを含んでいた。2つの組換え体のインサートを配列決定すると予想通りであることが判明した。これらのプラスミドをpTel280110及びpTel280111と命名した。これらのプラスミドは同一であり、双方ともが配列TTAGGGの80個の反復を含み、pTel28で生じていた欠失を原因として2つの配列(即ち、30番及び70番目の配列)の2個のヌクレオチド(TA)が欠失して配列TGGGが生じていた。従って、(最初の段階を除く)各クローニン

グ段階で合成テロメアの長さは倍加した。即ち、テロメアのサイズは指数関数的に増大した。テロメアは 60×2^n bp の長さを有しており、 n は実施した伸長クローニング段階の数を表す。従って、原則的には(大腸菌、または、例えば酵母のような任意の他の微生物宿主が長いタンデム型反復DNAを許容すると想定すると)、所望の任意のサイズの安全なテロメアを形成するために配列を

反復させることが可能である。

更に別の伸長段階では、pTe1280110をPacIで消化し、dNTPの存在下のクレノウポリメラーゼで平滑末端を形成し、次いでHindIIIで消化した。得られた0.5 kbのフラグメントをゲル精製した。プラスミドpTe1280111をSmaI及びHindIIIで開裂し、3.2 kbのフラグメントをゲル精製し、pTe1280110に由来の0.5 kbのフラグメントに結合させた。得られたプラスミドを用いてDH5 α 細胞を形質転換させた。アンピシリン選択に生き残った形質転換体からプラスミドDNAを精製した。選択した組換え体の9個を制限酵素分析によって試験して、1.0 kbのEcoRI/PstIフラグメントの有無を判定した。この結果、4つの組換え体(pT1k2、pT1k6、pT1k7及びpT1k8と命名)が配列TTAGGGの160個の反復を含む所望の960 bpのテロメアDNAインサート配列を含み、pTe128で生じた欠失を原因として2つのヌタレオチド(TA)が欠失した配列TGGGを有している4つの反復が存在することが判明した。フラグメントの両端から約300 bpが解明されたこれらのプラスミドのうちの2つのプラス

ミド(即ちpT1k2及びpT1k6)のEcoRI/PstIフラグメントの部分的DNA配列解析によって、この配列が配列TTAGGGの連続反復から構成されていることを確認した。

合成テロメア配列にPmeI部位及びBglII部位を付加するために、pT1k2をPacI及びPstIによって消化し、3.7 kbのフラグメント(即ち2.7 kbのpUC19と1.0 kbの反復配列)をゲル精製し、配列: 5'-GGGTTTAAACAGATCTCTGCA-3' (配列34) のオリゴヌ

クレオチドによって P s t I 付着末端に結合させた。次いで、結合産物をクレノウポリメラーゼ及び d N T P によって修復し、それ自体で結合させ、大腸菌 D H 5 α 株を形質転換させた。アンピシリン選択に生き残った合計 14 個の組換え体が得られた。各組換え体に由来のプラスミド DNA は B g l I I で開裂可能であり、これは、この付加された非反復制限部位が各組換え体によって保存されていたことを示す。14 個の組換え体のうちの 4 個の組換え体が 1 k b の完全合成テロメアインサートを含んでいたが、残りの 10 個の組換え体は種々の長さの欠失を有していた。1 k b の合成テロメア配列が完全に (i

n t a c t) 保存されていた 4 個のプラスミドを p T l k V 2、p T l k V 5、p T l k V 8 及び p T l k V 12 と命名した。これらのプラスミドの各々はまた P m e I で消化することが可能であった。更に、B g l I I 部位と P m e I 部位との双方が存在することが配列解析によって確認された。これらの 4 個のプラスミドはいずれも B a m H I 及び B g l I I によって消化されて、1 k b の合成テロメア配列を含むフラグメントを遊離でき、このテロメア配列を次に B g l I I 消化した p T E M P U D に結合し得る。

2. i n v i v o 染色体断片化のための p T E M P U D の使用

B g l I I によって p T E M P U D を直鎖化すると、一端にヒトテロメアをもつ直鎖状分子が得られる。この直鎖状フラグメントを染色体、例えばハイブリッド細胞のメガ染色体またはマウス主要サテライト配列の反復を含む任意のマウス染色体に組込むと、選択可能マーカーであるピューロマイシン耐性遺伝子が組込まれ、テロメア末端によってプラスミドが開裂される。D T 遺伝子は組込み及び発現のときに毒性であるため、完全直鎖状フラグメントがランダムイベントによって組込まれること

を阻止する。従ってランダム組込みは毒性であり、このため、ターゲットされた DNA に対する部位特異的組込みが選択されるであろう。このような組込みが、断片化された染色体を産生させる。

新規なテロメアをもつ断片化された欠失染色体は生き残り、動原体をもたない

他のフラグメントは消滅するであろう。in vivo断片化を繰返すことによって最終的には、可能な最小の機能性人工染色体が選択される。従ってこのベクターは、マウス染色体からミニクロモソームを作製するため、または、メガ染色体を断片化するために使用できる。原則として、このベクターは、断片化を行うために任意の染色体中の選択された任意のDNA配列をターゲットするために使用できる。

3. pTERPUDの構築

染色体をin vivo断片化するため、及び、部位特異的組込みによる大規模増幅を誘発するために好適であるがマウス主要サテライトDNAでなくマウスrDNA配列に基づく、pTEMPUDに類似の断片化／ターゲッティングベクターはpTERPUDと命名されている。このベクターにおいては、pTEMPUDのマウス主要サテライトDNA配列が、配列1

6のヌクレオチド10, 232-15, 000に対応する配列を含むメガ染色体クローン161の4770bpのBamHIフラグメントによって置換されている。

4. pHASPU D及びpTEMPHu3

ヒト染色体を特異的にターゲットするベクターをpTEMPUDから構築できる。これらのベクターは、選択されたサテライト配列に従って特異的ヒト染色体を断片化し、ヒトミニクロモソームを作製し、またヒト動原体を単離するために使用できる。

a. pHASPU D

pTEMPUDがヒト染色体の断片化に好適なプラスミドとなるように、マウス主要サテライト配列をヒトサテライト配列によって置換する。マウス染色体と違って、ヒト染色体の各々は、非反復サテライト配列を有している。例えば、マウス主要サテライトをヒト6量体αサテライト（またはアルホイド（alphoid）サテライト）DNA配列によって置換した。この配列はヒト結腸癌細胞系Colo320（受託番号ATCC CCL 220, 1で寄託）から単離されEMBLデータベースに受託番号X60716で寄託されたクローンpS12に

由

来の813bpのフラグメント(配列2のヌクレオチド232-1044)である。813bpのアルホイドフラグメントは、各々がEcoRI部位を含む合成プライマーを用いた核酸増幅によってpS12クローンから得られる。合成プライマーは、配列:

GGGGAATTTCAT TGGGATGTTT CAGTTGA (配列4)の順方向プライマーと、配列:

CGAAAGTCCCC CCTAGGAGAT CTTAAGGA (配列5)の逆方向プライマーとから成る。

増幅産物のEcoRI消化によってヒトαサテライト配列を含むEcoRI末端をもつフラグメントが得られる。この配列をマウス主要サテライトを含むEcoRIフラグメントに置換してpTEMPUDに挿入しpHASPUDを作製する。

ベクターpHASPUDをBglIIによって直鎖化し、画線添加(scrape loading)によってEJ30(ヒト線維芽)細胞の形質転換に使用する。27個のピューロマイシン耐性形質転換株が得られた。

b. pTEMPHu3

pTEMPHu3中では、マウス主要サテライト配列がD3Z1(ATCC受託番号85434で寄託; Yrokov (1

989) Cytogenet. Cell Genet. 51:1114も参照)に由来の3kbのヒト染色体3特異的αサテライトによって置換されている。

5. ヒト3番染色体における増幅を誘発するためのpTEMPHU3の使用

ヒト染色体の各々は非反復染色体特異的アルホイド配列を含む。従って、3番染色体特異的αサテライトにターゲットされたpTEMPHU3は、3番染色体の動原体領域の大規模増幅と新規な染色体の産生とが確保される選択条件下でヒト細胞に導入できる。このような誘発された大規模増幅は、新規な(denovo)染色体形成を誘発する手段を提供し、また、規定されたヒト染色体フラグメン

トをメガ塩基のサイズまで *in vivo* クローニングする手段を提供する。

例えば、3番ヒト染色体の破断点は動原体の近傍の短いアーム上に存在する。この領域は腎細胞癌の形成に関与する。pTEMPhu3をこの領域にターゲティングすることによってこの領域に大規模増幅が誘発され、pTEMPhu3ベクター中の細菌マーカー及び酵母マーカーを用いてこの領域をクローニングできる。

pTEMPhu3クローニングベクターは、相同組換え体の選択を可能にするだけでなく、YAC中で取込み部位の直接クローニングを可能にする。このベクターはまた、マウス-ヒトモノ染色体マイタロセルハイブリッド系中で、好ましくは欠失した短いアームをもつヒト3番染色体をターゲットするために使用できる。相同組換え体を核酸増幅（PCR）によってスクリーニングし、増幅をDNAハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、及び *in situ* ハイブリダイゼーションによってスクリーニングし得る。増幅領域をYACにクローニングできる。このベクター及びこれらの方法はまた、クローニングされた染色体領域の機能性分析を行うために、クローニングされた増幅領域を哺乳類細胞に再導入することによって使用できる。

B. 動原体のクローニング及び機能性染色体ユニットの同定に使用できるYACベクター中のライブラリーの調製

縮小されたサイズの機能性哺乳類人工染色体ユニットを作製し、このユニットを動原体DNAのクローニングに使用する別の方法では、YACベクターに基づく哺乳類DNAのライブラリーをスクリーニングし、トランスジェニックマウスモデル系

で潜在的陽性クローンの機能性を分析する。マウスのチロシナーゼ遺伝子を含む哺乳類DNAライブラリーを、YRT2 (Scheldら (1993) Nuc. Acids Res. 21:4783-4787参照) のようなYACベクター中で調製する。哺乳類のテロメア及び動原体の配列プローブに対するハイブリダイゼーションによってライブラリーをスクリーニングする。標準方法に従って陽

性クローンを単離し、NMR I / H a n マウスの受精卵母細胞の前核に微量注入する。次に、胚をNMR I / H a n の養母に移入する。トランスジェニック子孫中でのチロシナーゼ遺伝子の発現は同定可能な表現型（色素沈着）を与える。従って、チロシナーゼを発現するトランスジェニックマウスを生じるクローンは機能性哺乳類人工染色体ユニットを含むことが確認される。

あるいは、上記の標準方法に従って、S A T A C のフラグメントをY A C ベクターに導入し、次いでNMR I / H a n マウスの受精卵母細胞の前核に導入してもよい。これによって、チロシナーゼを発現するトランスジェニックマウスを生じるクローンは、機能性哺乳類人工染色体ユニット、特に動原体を含むことが確認される。

C. 相同ターゲッティングベクターを用いた哺乳類人工染色体によるヘテロログス遺伝子の取込み

上述のように、ヘテロログス遺伝子を発現させるために哺乳類人工染色体を使用すると、レシビエント細胞ゲノム内へのヘテロログスプラスミドDNAのランダム組込みに起因するいくつかの不利な効果が回避される。ランダム組込みに伴う不利な効果を回避するための有効なツールとなり得る哺乳類人工染色体の本質的な特徴は、この染色体がレシビエント細胞中にゲノム外遺伝子ソースとして存在することにある。従って、哺乳類人工染色体からヘテロログス遺伝子を発現させるためには、レシビエント細胞ゲノム内への不要なランダム組込みを生じることなく、哺乳類人工染色体に限定されたヘテロログス遺伝子の特異的なターゲット化取込みが望ましい。

ヘテロログス遺伝子を人工染色体に部位特異的に組込む1つの手段では、相同ターゲッティングベクターを使用する。人工染色体に存在するヌクレオチドに相同な核酸配列を含むターゲッティングベクターに、有益なヘテロログス遺伝子をサブクローニングする。次に、ベクターと染色体との相同部位の組換えイベントによって人工染色体で部位特異的組込みが生じるような

方法でベクターを人工染色体含有細胞に導入する。相同ターゲッティングベクタ

一はまた、人工染色体にベクターを取込んだ細胞を容易に同定するための選択可能マーカーと、レシピエント細胞ゲノム内への不要なベクター組込みが生じたときにのみ発現される致死選択遺伝子とを含み得る。代表的な2つの相同ターゲティングベクター、 λ CF-7及びp λ CF-7-DTAを以下に記載する。

1. ベクター λ CF-7の構築

ベクター λ CF-7は、遺伝子治療に使用される哺乳類人工染色体に取込まれ得る治療用分子をコードする代表的な核酸として嚢胞性線維症トランスメンブランコンダクタンス調節因子(CFTR)遺伝子を含む。選択可能マーカーとしてピューロマイシン耐性遺伝子を含み、またパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のura3遺伝子(オロチジン-5-ホスフェートデカルボキシラーゼ)を更に含むこのベクターを以下の一連段階で構築した。

a. pURAの構築

S. cerevisiae ura3遺伝子を含む酵母人工染色体ベクターpYAC5 (Sigma; YACベクターの記

述に関してはBurkeら(1987) *Science* 236:806-812参照; pYAC5の完全配列に関してはGenBank受託番号U01086参照)に由来の2.6 kbのSalI/XhoIフラグメントを、pHygの3.3 kbのSalI/SmaIフラグメント(例えば、米国特許第4,997,764号、第4,686,186号及び第5,162,215号、並びに前記参照)に結合させることによってプラスミドpURAを調製した。結合に先立って、pHygの3.3 kbフラグメントのSmaI末端に平滑末端結合できるようにXhoI末端をクレノウポリメラーゼによって処理した。従って、pURAは*S. cerevisiae* ura3遺伝子と大腸菌ColEIの複製起点とアンピシリン耐性遺伝子とを含む。組込まれた構築物をYACクローンとして哺乳類細胞から回収する手段を提供するためにuraE遺伝子が含まれている。

b. pUP2の構築

プラスミドpURAをSalIで消化し、pCEPURの1.5 kbのSalIフラグメントに結合させた。プラスミドpCEPURは、pCEP4 (Inv

itrogen) のNheI-NruIフラグメントに、pBabe-puro
の1.1k

bのSnaBI-NhaIフラグメントを結合させることによって調製した (Morgensternら (1990) Nucl. Acids Res. 18:3587-3596; Dr. L. Szekely (Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institutet, Stockholm) によって提供された; また、Tonghuaら (1995) Chin. Med. J. (Beijing, Engl. Ed.) 108:653-659; Coutoら (1994) Infect. Immun. 62:2375-2378; Dunckleyら (1992) FEBS Lett. 296:128-34; Frenchら (1995) Anal. Biochem. 228:354-355; Liuら (1995) Blood 85:1095-1103; 国際PCT出願WO9520044; WO9500178及びWO9419456参照)。

得られたプラスミドpUP2は、pURAの全部の要素に加えて、pCEPU
Rに由来のSV40プロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたビ
ューロマイシン耐性遺伝子を含む。

c. pUP-CFTRの構築

1つのプラスミド中でpUP2の要素をCFTR遺伝子と組み合わせるために中
間プラスミドpUP-CFTRを作製した。まず、エプスタイン・バールウイル
ス (EBV) に基づくベクターpCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA; Yatesら (1985) Nature 313:812-815参照; また、米国特許第5,468,615号参照) の多数クローニング部
位のCMVプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルとの間にCFTR遺
伝子を挿入するために、CFTRをコードするDNA (Riordanら (1989) Science 245:1066-1073参照; CFTR遺伝子の配
列に関しては米国特許第5,240,846号及びGenbank受託番号M2

8668参照)を含むpCMV-CFTRのCFTR遺伝子だけを含んでいる4.5 kbのSal Iフラグメントを、Xho I消化したpCEP4 (Invitrogen及び本文中にも記載)に結合させた。得られたプラスミドをpCEP-CFTRと命名した。プラスミドpCEP-CFTRを次にSal Iで消化し、CMVプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルとが隣接したCFTR遺伝子

を含む5.8 kbのフラグメントを、Sal I消化したpUP2に結合させてpUP-CFTRを作製した。従って、pUP-CFTRは、pUP2の全部の要素に加えて、CMVプロモーター及びSV40ポリアデニル化シグナルに連結されたCFTR遺伝子を含む。

d. λCF-7の構築

次に、プラスミドpUP-CFTRをEcoRIで部分消化することによって直鎖化し、CFTR遺伝子を含む13 kbのフラグメントを、EcoRI消化したCharon 4Aλに結合させた(Charon 4Aλの記述に関しては、Blattnerら(1977) Science 196:161; Williams and Blattner (1979) J. Virol. 29:555;及びSambrookら(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volume 1, Section 2.18参照)。得られたベクターλCF8は、Charon 4Aλバクテリオファージの左アームと、CMVプロモーター及びSV40ポリア

デニル化シグナルに連結されたCFTR遺伝子と、ura3遺伝子と、SV40プロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、チミジンキナーゼプロモーター(TK)と、ColEI複製起点と、アンピシリン耐性遺伝子と、Charon 4Aλバクテリオファージの右アームとを含む。λCF8構築物を次にXho Iで消化し、得られた27.1 kbを、

SV40ポリAシグナルとEcoRI消化したCharon 4Aλの右アームとを含むpJB P86（後述）の0.4 kbのXhoI/EcoRIフラグメントに結合させた。得られたベクターλCF-7は、Charon 4Aλの左アームと、CMVプロモーター及びSV40ポリAシグナルに連結されたCFTRのコーディングDNAと、ura3遺伝子と、SV40プロモーター及びポリAデニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、Charon 4Aλの右アームとを含む。λDNAフラグメントは、代表的な人工染色体に存在するヌクレオチドに相同なコード配列を提供する。

次に、本文中に例示した人工染色体を含む細胞にベクターを導入する。例えば、本文中に記載のようなメガ染色体を担持す

る融合細胞系に直鎖状λCF-7ベクターを導入するとき、このベクターは、ベクターと人工染色体との相同パタテリオファージλ配列間の組換えによってメガ染色体に特異的に組込まれるであろう。

2. ベクターλCF-7-DTAの構築

ベクターλCF-7-DTAもまた、λCF-7に含まれている全部の要素を含み、加えて、致死選択マーカーとジフテリア毒素A（DT-A）遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子と複製起点とを含む。このベクターを以下の一連段階で構築した。

a. pJB P86の構築

上記λCF-7の構築にプラスミドpJB P86を使用した。SV40プロモーター及びポリAデニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子を含むpCEPURの1.5 kbのSalIフラグメントを、HindIII消化したpJB8に結合させた（例えばIsh-Horowitzら（1981）Nucleic Acids Res. 9:2989-2998参照；ATCC受託番号37074から入手可能；Amersham, Arlington Heights, ILの市販製品）。結合に先立って、pCEPURの1.5 kbフラ

グメントのSalI末端とHindIII直鎖化したpJB8末端とをクレノウポリメラーゼによって処理した。得られたベクターpJB86は、SV40プロモーター及びポリAシグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、Charron 4Aλの1.8kbのCOS領域と、ColE1複製起点と、アンピシリン耐性遺伝子とを含む。

b. pMEP-DTAの構築

ジフテリア毒素-A遺伝子を含むpMC1-DT-A (例えばMaxwellら(1986) Cancer Res. 46:4660-4666参照)の1.1kbのXhoI/SalIフラグメントを、XhoI消化したpMEP4 (Invitrogen, San Diego, CA)に結合させてpMEP-DTAを作製した。pMC1-DT-Aを作製するためには、DTA遺伝子のコーディング領域をp2249-1から800bpのPstI/HindIIIフラグメントとして単離し、pMC1neopolyA (Stratageneから入手可能なpMC1)のneo遺伝子に置換してTKプロモーターのコントロール下に導入した。得られた構築物pMC1DT-AをHindIIIで消化し、クレノウで末端を埋め戻し、Sa

IIリンカーを結合させて、XhoI末端(5')と、270bpのTKプロモーターと、~790bpのDT-Aフラグメントとを含むSalI末端とをもつ1061bpのTK-DTA遺伝子カセットを作製した。このフラグメントをXhoI消化したpMEP4に結合させた。

従って、プラスミドpMEP-DTAは、TKプロモーター及びSV40に連結されたDT-A遺伝子と、ColE1複製起点とアンピシリン耐性遺伝子とを含む。

c. pJB83-DTA9の構築

プラスミドpJB8をHindIII及びClaIで消化し、オリゴヌクレオチド(オリゴヌクレオチドのセンス鎖としては配列7参照、アンチセンス鎖としては配列8参照)に結合させてpJB83を作製した。ClaI/HindIII消化したpJB8に結合したオリゴヌクレオチドは、制限エンドヌクレアーゼ

Swa I、Pac I及びSrf Iの認識部位を含んでいた。これらの部位はpλCF-7-DTA構築物の直鎖化を容易にする。

次に、DT-A遺伝子を含むpMEP-DTAの1.4 kbのXho I/Sa I Iフラグメントを、Sa I I消化したpJ

B83に結合させてpJB83-DTA9を作製した。

d. λCF-7-DTAの構築

λCF-7の12 bpのオーバーハングを、Mung beanヌタレアーゼ及びT4ポリメラーゼを順次用いた処理によって除去した。得られた41.1 kbの直鎖状λCF-7ベクターを、Cla Iで消化しT4ポリメラーゼで処理しておいたpFB83-DTA9に結合させた。得られたベクターλCF-7-DTAは、λCF-7の全部の要素と、TKプロモーター及びSV40ポリアデニル化シグナルに連結されたDT-A遺伝子と、1.8 kbのCharon 4A λCOS領域と、アンピシリン耐性遺伝子（pJB83-DTA9に由来）と、ColEI複製起点（pJB83-DTA9に由来）とを含む。

D. ルシフェラーゼマーカーを用いるターゲッティングベクター：プラスミドpMCT-RUC

哺乳類人工染色体にRenillaルシフェラーゼ遺伝子を部位特異的にターゲットするプラスミドpMCT-RUC（14 kbp）を構築した（RenillaルシフェラーゼをコードするDNA及びこのようなベクターを構築するための出発物質を提供し得るプラスミドpTZrLuc-1の記述に関して

は米国特許第5,292,658号及び第5,418,155号参照）。このプラスミドの有利な特徴は、Renillaルシフェラーゼ遺伝子がヒトサイトメガロウイルスの前初期遺伝子エンハンサー／プロモーターの転写調節下に維持されていること、及び、正の選択可能マーカーであるヒグロマイシン耐性遺伝子がチミジンキナーゼプロモーターの転写調節下に維持されていることである。特にこのプラスミドは、ミニクロモソームに相同のDNA（即ちネオマイシン耐性遺伝子）を含むプラスミドpAG60（米国特許第5,118,620号、第5,

021, 344号、第5, 063, 162号及び第4, 946, 952号参照；また、Colbert-Gaparinら（1981）*J. Mol. Biol.* 150:1-14参照）と、Renilla遺伝子及びヒグロマイシン耐性遺伝子と、相同組換えの負の選択可能マーカーであるtkプロモーターのコントロール下のHSG-tk遺伝子と、プラスミドを直鎖化するための非反復Hpai部位とを含む。

この構築物を、リン酸カルシウムトランスフェクションによってEC3/7C5細胞に導入した（Lorenzら（1996）*J. Biol. Chem.* 271:31-37

参照）。EC3/7C5細胞を単層として維持した（Gluzman（1981）*Cell* 23:175-183参照）。プレートあたり10 μ gの直鎖化したpMCT-RUCを用いるリン酸カルシウムトランスフェクション（Harperら（1981）*Chromosoma* 83:431-439参照）を行うために、100mmのシャーレ中で50%集密度の細胞を使用した。単一のトランスフェクト細胞に由来するコロニーを単離し、ヒグロマイシン（300 μ g/ml）と10%ウシ胎仔血清とを含むF-12培地に維持した。Renillaルシフェラーゼアッセイに先立って細胞を100mmのシャーレで増殖させた。

Renillaルシフェラーゼアッセイを実施した（例えば、Matthewsら（1977）*Biochemistry* 16:85-91参照）。in vivo及びin vitroの発光を測定するために、直鎖化したプラスミドpMCT-RUCをEC3/7C5細胞（“B”細胞系）にトランスフェクトした後、得られたヒグロマイシン耐性細胞系を、100%集密度まで増殖させた。約30世代後のin vivoの発光を以下の手順で測定した。増殖培地を除去し、コエレンテラジン

（coelenterazine）（最終濃度1ミリモル/リットル）を含む1mlのRPMI 1640で置換した。次に、シャーレを弱光の映像解析装置（Hamamatsu Argus-100）に配置することによって細胞から放

出された発光を可視化した。100%感度の光子計数管を用いて5分間の光子蓄積後に画像を形成した。in vitroの発光を測定するために、細胞をトリプシン処理し、1つのシャーレから採取し、ペレット化し、1mlのアッセイバッファ（0.5モル/リットルのNaCl、1ミリモル/リットルのEDTA、0.1モル/リットルのリン酸カルシウム、pH7.4）に再懸濁させ、氷上で10秒間音波処理した。次に、1ミリモル/リットルの濃度のコエレンテラジン0.5mlを速やかに注入後、溶解液をTurner TD-20セルミノメーターで10秒間検定し、発光の平均値をLUとして記録した（この器具で1LU = 1.6×10^6 hu/秒）。

直鎖化したプラスミドpMCT-RUCによってトランスフェクトされたEC3/7C5細胞の独立細胞系は異なるレベルのRenillaルシフェラーゼ活性を示した。同じ細胞系の溶解液を用いて測定試験を行ったときにも発光は同様の違いを

示した。発光のこの違いは、マウスゲノム内へのプラスミドpMCT-RUCのランダム組込みによって生じた位置効果に起因すると考えられる。何故なら、この実験ではルシフェラーゼ遺伝子の部位ターゲティングを目的とした濃縮を行わなかったからである。

ミニクロモソームに組込まれたルシフェラーゼ遺伝子を含む細胞が濃縮されたトランスフェクタント集団を得るために、トランスフェクト細胞をガンシクロピルの存在下で増殖させた。この負の選択培地は、添加されたpMCT-RUCプラスミドがゲノムに組込まれた宿主細胞EC3/7C5の増殖を抑制する。従ってこの選択に生き残ったトランスフェクト集団中では、pMCT-RUCが組込まれたミニクロモソームを含む細胞が濃縮されている。この選択に生き残った細胞をルシフェラーゼアッセイによって試験すると、より均一なレベルのルシフェラーゼ発現を示した。更に、in situハイブリダイゼーションアッセイの結果は、Renillaルシフェラーゼ遺伝子がこれらの細胞のミニクロモソームに含まれていることを示し、これは更に、ミニクロモソームに対するpMCT-RUCのターゲティングが成功したことを示す。

また、ミニクロモソームに相同な伸長領域を与えるために更にλ DNAを含むpMCT-RUCの変種（後述の“他のターゲッティングベクター”の項参照）をEC3/7C5細胞にトランスフェクトした。レシピエントEC3/7C5細胞中のミニクロモソームに対してpNEM-1中のRenillaルシフェラーゼ遺伝子及びヒグロマイシン耐性遺伝子の部位特異的ターゲッティングを行った。これを、DNA増幅分析及びin situハイブリダイゼーションによって確認した。更に、トランスフェクタントのルシフェラーゼアッセイによってルシフェラーゼ遺伝子発現を確認した。

E. タンパク質分泌用ターゲッティングベクター

哺乳類細胞発現系において細胞内産生されたヘテロログスタンパク質を単離するためには、苛酷にもなり得る条件下で細胞破壊を行うこと、及び、細胞夾雑物から組換えタンパク質を精製することが必要である。組換え産生されたタンパク質を、精製による除去を要する夾雑物の少ない細胞外媒質に分泌させることによって、タンパク質単離のプロセスを簡単にすることができる。従って、哺乳類の人工染色体系と共に使用するための分泌用ターゲッティングベクターを構築した。

哺乳類細胞中のヘテロログスタンパク質の産生及び分泌を示す有用なモデルベクターは、タンパク質を細胞膜に輸送すること及び細胞からタンパク質を分泌することを指令する有効な分泌シグナルに融合した検出容易なリポータータンパク質をコードするDNAを含む。後述するベクターpLNCX-ILRUC及びpLNCX-ILRUCはこのようなベクターの例である。これらのベクターは、インターロイキン-2 (IL2) のシグナルペプチドとRenilla reniformisルシフェラーゼとの融合タンパク質をコードするDNAを含む。IL-2のシグナルペプチド（配列9に示す配列によってコードされている）は、該ペプチドに連結されたルシフェラーゼタンパク質を哺乳類細胞から分泌するように指令する。宿主哺乳類細胞から分泌されると、IL-2のシグナルペプチドが融合タンパク質から切断され、活性ルシフェラーゼタンパク質が細胞外媒質に放出される。このヘテロログスタンパク質の産生及び分泌の成否は、媒質に

ルシフェラーゼ酵素の生物発光ルシフェリン基質を接触させたときに生じる発光を測定するルシフェラーゼアッセイによって容易に検出できる。この特徴は、人工染色体を遺伝子治療に使用するときには有用であろう。治療用遺

伝子に融合した IL-RUC を担持する機能性人工染色体の存在を容易にモニターできる。体液または体組織のサンプルを採取し、ルシフェリンと適正な補因子とを添加し、生物発光を観察することによってルシフェラーゼ発現を試験し得る。

1. タンパク質分泌用ベクター pLNCX-ILRUC の構築

ベクター pLNCX-ILRUC は、哺乳類細胞中で遺伝子を構成的に発現させるためにヒトサイトメガロウイルス (CMV) の前初期プロモーターに連結されたヒト IL-2 シグナルペプチド-R. reniformis 融合遺伝子を含む。構築物を以下の手順で調製した。

a. IL-2 シグナル配列をコードする DNA の調製

適当な IL-2 プライマーを用いた HEK 293 細胞系の核酸増幅によって、ヒト IL-2 シグナルペプチドをコードする DNA を含む 69 bp の DNA フラグメントが得られた (例えば、IL-2 をコードする DNA に関しては米国特許第 4, 518, 584 号及び配列 9 参照; IL-2 遺伝子及び対応するアミノ酸配列は Genbank Sequence Database で受託番号 K02056 及び J00264 として提供される)。シグナルペプチドは、双方の Genbank に収

録された翻訳産物及び配列 9 の最初の 20 個のアミノ酸を含む。最初の 20 個のアミノ酸をコードする対応するヌクレオチド配列は、上記の収録された翻訳産物の配列 (例えば、受託番号 K02056 のヌクレオチド 293-52 及び受託番号 J00264 のヌクレオチド 478-537) 中に示されており、また、配列 9 に示されている。増幅プライマーは、pGEMT (Promega) に結合後の DNA フラグメントをサブクローニングするための EcoRI 部位 (GAATTC) を含んでいた。順方向プライマーを配列 11 に示し、逆方向プライマーを

配列12に示す。

T T T G A A T T C A T G T A C A G G A T G C A A C T C C

T G (順方向、配列11)、

T T T G A A T T C A G T A G G T G C A C T G T T T G T G

A C (逆方向、配列12)。

b. R. reniformis ルシフェラーゼをコードするDNAの調製

R. reniformis ルシフェラーゼ遺伝子の出発ソースはプラスミド pLXSN-RUC であった。ベクター pLXSN (例えば、米国特許第 5, 324, 655 号、第 5, 47

0, 730 号、第 5, 468, 634 号及び第 5, 358, 866 号並びに Miller ら (1989) Biotechniques 7:980 参照) は、ヘテロガス DNA をレトロウイルス LTR の転写調節下に発現させ得るレトロウイルスベクターである。このベクターは更に、SV40 初期領域プロモーターに発現動作可能に連結されたネオマイシン耐性遺伝子を含む。R. reniformis ルシフェラーゼ遺伝子をプラスミド pTZrLuc-1 (例えば、米国特許第 5, 292, 658 号参照; また、Genbank Sequence Database 受託番号 M63501 参照; また、Lorenz ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:4438-4442 参照) から入手し、配列10に示す。pTZrLuc-1 の 0.97 kb の EcoRI/SmaI フラグメントは、Renilla ルシフェラーゼをコードする DNA のコーディング領域を含む。ベクター pLXSN を消化し、pLXSN-RUC に含まれたルシフェラーゼ遺伝子に結合させた。pLXSN-RUC は、ネオマイシン耐性遺伝子の発現を指令する SV40 プロモーターの上流でウイルス LTR に作動可能に連結されたルシフェラーゼ遺伝子を含ん

でいた。

c. pLXSN-ILRUC を作製するための IL-2 シグナルペプチドをコー

ドするDNAとR. reniformis ルシフェラーゼ遺伝子との融合

項1. aで前述したIL-2シグナルペプチドをコードするDNAを含むベクターpGEMTをEcoRIで消化し、得られたシグナルペプチドをコードするフラグメントを、EcoRI消化したpLXSN-RUCに結合させた。得られたプラスミドをpLXSN-ILRUCと命名したが、このプラスミドは、pLXSN-RUC中のR. reniformis 遺伝子の直ぐ上流にIL-2シグナルペプチドをコードするDNAを含む。次に、融合遺伝子の3' 端にSmaI 部位を付加するために融合遺伝子の核酸増幅鋳型としてプラスミドpLXSN-ILRUCを使用した。直鎖化した(EcoRI/SmaI消化した)pGEMT (Promega)に増幅産物をサブクローニングしてILRUC-pGEMTを作製した。

d. 哺乳類細胞中で発現させる調節要素を含むベクターへの融合遺伝子の導入
プラスミドILRUC-pGEMTをKspI及びSmaI

で消化し、IL-2シグナルペプチドールシフェラーゼ融合遺伝子を含むフラグメントを遊離させ、これをHpaI消化したpLNCXに結合させた。ベクターpLNCX (例えば、米国特許第5, 324, 655号及び第5, 457, 182号参照; また、Miller and Rosman (1989) Biotechnology 7: 980-990参照) は、ヘテロログスDNAをCMVプロモーターのコントロール下に発現させるレトロウイルスベクターである。このベクターはまた、ウイルスプロモーターの転写調節下のネオマイシン耐性遺伝子を含む。結合反応によって得られたベクターをpLNCX-ILRUCと命名した。ベクターpLNCX-ILRUCは、pLNCX中のCMVプロモーターの直ぐ下流でウイルス3' LTR及びポリアダニル化シグナルの上流にIL-2シグナルペプチドールシフェラーゼ融合遺伝子を含む。この配置によって融合遺伝子がCMVプロモーターのコントロール下で発現し得る。ヘテロログスタンパク質をコードするDNA (即ち、ルシフェラーゼ遺伝子) がIL-2シグナルペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された配置によって、ベクターがトランスフェクトされた哺乳類細胞中で融合タンパク質が発現され、

ヘテロログスタンパク質が宿主細胞から細胞外媒質に分泌される。

2. タンパク質分泌用ターゲッティングベクター pLNCX-ILRUC λ の構築

IL-2 シグナルペプチド-ルシフェラーゼ融合遺伝子を宿主細胞の哺乳類人工染色体に導入するために、ベクター pLNCX-ILRUC を修飾して使用するとよい。pLNCX-ILRUC 発現ベクターによる哺乳類人工染色体の特異的取込みを促進するために、人工染色体に存在するヌクレオチドに相同な核酸配列を部位特異的組換え可能な状態でベクターに付加する。

本文中に記載の代表的人工染色体は λ ファージ DNA を含む。従って、分泌ベクター pLNCX-ILRUC を作製するために、 λ ファージ DNA (Charon 4A アームに由来) を添加することによってタンパク質分泌用ターゲッティングベクター pLNCX-ILRUC を調製した。

3. 哺乳類細胞からの R. reniformis ルシフェラーゼの発現及び分泌 a. pLNCX-ILRUC を用いる R. reniformis ル

シフェラーゼの発現

エレクトロポレーション (BIORAD、製造業者の指示通りに実施) によって、哺乳類細胞 (LMTK-, ACTT から入手) にベクター pLNCX-ILRUC ($\sim 10 \mu\text{g}$) を一過性にトランスフェクトした。また、neo 選択用 G418 中の増殖によって産生された安定なトランスフェクタントも調製した。

トランスフェクタントを増殖させ、次いでルシフェラーゼの発現を分析した。トランスフェクト細胞から活性ルシフェラーゼが分泌されたか否かを判定するために、コエレントラジンの添加によって培養培地のルシフェラーゼを検定した (例えば、Matthews ら (1977) Biochemistry 16: 85-91 参照)。

これらのアッセイの結果は、ベクター pLNCX-ILRUC が哺乳類宿主細胞中でヘテロログ DNA を構成的に発現し得ることを確認する。これらの結果は更に、ヒト IL-2 シグナルペプチドはペプチドの C 末端に融合したタンパク質の分泌を指令し得ることを証明する。加えて、これらのデータは、R. ren

iformis ルシフェラーゼタンパク質が極めて有効なリポーター分子であり、哺乳類細胞環境で安定であり、高感

度の容易な遺伝子発現アッセイの基礎となることを示す。

b. LMTK-細胞から分泌されると考えられる Renilla reniformis ルシフェラーゼ

(i) 細胞ペレットの Renilla ルシフェラーゼアッセイ

以下の細胞を試験した：

ベクター非含有細胞：陰性対照としてベクター非含有の LMTK-細胞；

pLNCX 単独をトランスフェクトした細胞；

RUC-pLNCX (pLNCX ベクター中に Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を含むベクター) をトランスフェクトした細胞；

pLNCX-ILRUC (pLNCX ベクター中に IL-2 リーダー配列 + Renilla ルシフェラーゼ融合遺伝子を含むベクター) をトランスフェクトした細胞。

エレクトロポレーションの 48 時間後、細胞及び培養培地を収集した。4 つのプレートの細胞から得られた細胞ペレットを 1 ml のアッセイバッファに再懸濁させ、音波処理によって溶解した。200 μ l の再懸濁細胞ペレットを各ルシフェラーゼ活性アッセイに使用した (例えば、Matthews ら (19

77) Biochemistry 16:85-91 参照)。アッセイを 3 回繰返し、生物発光の平均測定値を算出した。

結果は、pLNCX をトランスフェクトした細胞または陰性対照細胞中に比較的低いバックグラウンド生物発光が存在することを示した。IL-2 リーダー配列-ルシフェラーゼ遺伝子融合ベクターを含む細胞に由来の細胞ペレット中では低レベルが観察され、RUC-pLNCX を含む細胞サンプル中では 5,000 RLU を上回る値が観察された。

(ii) 細胞培地の Renilla ルシフェラーゼアッセイ

4 つの細胞プレートに由来の 40 ミリリットルの培地を採取して遠心沈殿させ

た。各ルシフェラーゼ活性アッセイに200マイクロリットルの培地を使用した。アッセイを数回繰返し、生物発光の平均測定値を算出した。これらの結果は、pLNCX-ILRUCで形質転換させた細胞の細胞培地中で比較的高いレベルの生物発光が検出されることを示した。RUC-pLNCXをトランスフェクトした細胞中の検出レベルは約1/10という低い値（ベクター非含有またはpLNCX単独をトランスフェクトした細胞の培地中のバックグラウンドレベルをやや上回る値）であった。

(iii) 結論

これらの実験の結果は、RenillaルシフェラーゼがIL-2シグナルペプチドの指令下でLMTK-細胞から分泌され则认为られることを示した。IL-2分泌シグナルをコードするDNAに連結されたRenillaルシフェラーゼをコードするDNAをトランスフェクトした細胞の培地は、対照またはルシフェラーゼをコードするDNAを含むがシグナルペプチドをコードするDNAを含まない細胞よりも実質的に高いレベルのRenillaルシフェラーゼ活性を有していた。また、対照とルシフェラーゼをコードするDNAを含む細胞との差は、ルシフェラーゼ活性がルシフェラーゼ特異的であり、非特異的反応に由来しないことを示す。更に、RUC-pLNCXをトランスフェクトした細胞の培地から得られた結果がバックグラウンドと同様であることは、培地中のルシフェラーゼ活性が細胞溶解に由来するのではなく分泌ルシフェラーゼに由来することを示す。

c. pLNCX-ILRUCを用いたR. reniformisルシフェラーゼの発現

哺乳類人工染色体からIL-2シグナルペプチド-R. re

niformis融合遺伝子を発現させるために、ベクターpLNCX-ILRUCは、哺乳類人工染色体に含まれているλDNA配列との相同組換えによって哺乳類人工染色体に部位特異的に組込まれるようにターゲットされる。これは、哺乳類人工染色体を担持している融合細胞系または哺乳類人工染色体を含む哺

乳類宿主細胞に pLNCX-ILRUC λ を導入することによって行われる。例えばベクターのマイクロインジェクションまたはベクターによる融合細胞系のトランスフェクションを介して人工染色体を担持している融合細胞系にベクターが導入される場合、細胞を選択的条件下で増殖させる。ベクター pLNCX-ILRUC λ を取込んだ人工染色体を、前述のような精製手順を用いて生存細胞から単離し、次いで哺乳類宿主細胞に注入する。

あるいは、融合細胞系から単離しておいた哺乳類人工染色体を最初に哺乳類宿主細胞に注入してもよい。次に、宿主細胞にベクター pLNCX-ILRUC λ をトランスフェクトして増殖させる。

次に、組換え宿主細胞のルシフェラーゼ発現を上述の手順で検定する。

F. 他のターゲッティングベクター

ベクター pMCT-RUCに基づくこれらのベクターは二重組換え体の挿入及び選択を確保するために正の選択及び負の選択に依存する。1回の交差によって細胞を殺傷する DT-A が取込まれ、2回の交差組換えによって DT-1 遺伝子が欠失する。

1. プラスミド pNEM1 は以下の要素を含む。

DT-A : ジフテリア毒素遺伝子 (負の選択可能マーカー) と、

Hyg : ヒグロマイシン遺伝子 (正の選択可能マーカー) と、

ruc : Renilla ルシフェラーゼ遺伝子 (非選択可能マーカー) と、

1 : LTR-MMTV プロモーターと、

2 : TK プロモーターと、

3 : CMV プロモーターと、

MMR : 相同領域 (プラスミド pAG60)。

2. プラスミド pNEM-2 及び -3 は異なる負の選択可能マーカーを有する以外は pNEM1 に等しい。

pNEM-1 : “-” 選択可能マーカーとしてジフテリア毒素遺伝子、

pNEM-2 : “-” 選択可能マーカーとしてヒグロマイシンアンチセンス遺伝

子、

pNEM-3：“-”選択可能マーカーとしてチミジンキナーゼHSV-1遺伝子。

3. プラスミドλDNAに基づく相同

pNEMλ-1：ベースベクター、

pNEMλ-2：p5＝遺伝子を含むベースベクター、

1：LTR MMTVプロモーター、

2：SV40プロモーター、

3：CMVプロモーター、

4：μTIIAプロモーター（メタロチオネイン遺伝子プロモーター）。

—相同領域（プラスミドpAG60）

λの左右のアームのλL、A、及びλR、A、相同領域（λgt-WES）。

実施例13

哺乳類細胞に対するプラスミドDNAのマイクロインジェクション

これらの手順は、哺乳類細胞、昆虫類細胞などの真核細胞に

MACを微量注入するために使用される。

マイクロインジェクション技術は、細胞内デリバリーシステムとして小さいガラス毛细管を使用する技術であり、DNAフラグメントを核に導入するために使用されている（例えば、Chalfieら（1994）Science 263：802-804参照）。この技術によって、ホルモン、タンパク質、DNA及びRNAなどのほぼすべての種類の分子をレシピエント細胞の細胞質または核に導入することが可能である。この技術では、扱う細胞の種類の制限もなく、Ca²⁺ + 仲介型遺伝子導入及びリボソーム仲介型遺伝子導入のような他の方法よりも効率が高い。注入された細胞の約20～30%が形質転換に成功する。

マイクロインジェクションは位相差顕微鏡の観察下で行う。マイクロマニピュレータを用い、予めDNAサンプルを充填したガラス微量毛细管を注入対象細胞に向ける。毛细管に接続されたトランスジェクターから適度な空気圧を作用させることによって適量のサンプル（1～10μl）を細胞に移入する。注入された

細胞の位置を特定し易いように、番号を付けた方眼をプリントしたガラススライド上でレシピエント細胞を増殖させ

る。

a. 材料及び装置

35×10mmのNunc lon組織培養皿、マウス細胞系EC3/7C5プラスミドDNA pCH110 (Pharmacia)、精製した緑色蛍光タンパク質 (Purified Green Fluorescent Protein, GFP) (Aequorea及びRenillaに由来のGFPは精製されており、GFPをコードするDNAもクローニングされている。例えば、Prasherら (1992) Gene 111:229-233; 米国特許出願08/119,678及び08/192,264に基づく国際PCT出願WO95/07463参照)、ZEISS Axiovert 100顕微鏡、エッペンドルフトランスジェクター5246、エッペンドルフマイタロマニピュレータ5171、エッペンドルフのセロケート・カバースライド、エッペンドルフ微量充填器、エッペンドルフのフェムトチップス及びその他の標準装置。

b. 注入プロトコル

(1) 35mmの組織培養皿 (37℃、5%CO₂) で細胞密度が80%集密度に達するまで線維芽細胞を増殖させる。インキ

ュベータから皿を取出し、培地を深さ約5mmまで加える。

(2) 皿ホルダーに皿を載せ、倍率10×の対物レンズで細胞を観察する。細胞表面上方に焦点を合わせるのが望ましい。

(3) 微粒状落屑を完全に除去するために十分な遠心力でDNAサンプルを遠心 (典型的には微量遠心管で約10,000rpmで10分間) することによって、プラスミドまたは染色体DNA溶液 (1ng/μl) 及びGFPタンパク質溶液を更に精製する。

(4) 2つの2μlのDNA溶液 (1ng/μl) をエッペンドルフ微量充填器で微量毛細管に充填する。充填中、微量毛細管の先端に充填器を挿入する。GF

P (1 mg/ml) を同じ手順で充填する。

(5) 微量毛細管から保護シースを外し、微量毛細管をマイクロマニピュレータに接続した毛細管ホルダーに固定する。

(6) 毛細管の先端を培地の表面まで下降させ、徐々に細胞に焦点を合わせていきながら毛細管の先端を細胞の表面に到達させる。更に下降させて毛細管を細胞に挿入する。毛細管のレベル、時間及び圧力のような種々のパラメーターは特定装置毎に決定される。例えば、線維芽細胞系 C5 と上記装置とを使用し

たときの最良条件は、注入時間 0.4 秒、圧力 80 psi である。DNA は次に細胞の核に自動的に注入される。

(7) 注入後、細胞をインキュベータに戻し、約 18～24 時間インキュベートする。

(8) インキュベーション後、選択マーカーに依存する適当な方法で形質転換体の数を測定し得る。例えば、緑色蛍光タンパク質を使用する場合、UV 光源及び注入後 0～24 時間に設定した蛍光フィルターを使用してアッセイを実施し得る。pHC110 に由来の DNA のような β -gal 含有 DNA を注入した場合、形質転換体の β -gal を検定し得る。

(c) プラスミド DNA が注入された細胞中の β -ガラクトシターゼの検出

培養プレートから培地を除去し、5 ml の定着溶液 (1% のグルタルアルデヒド; 0.1 M のリン酸ナトリウムバッファ溶液; 1 mM の $MgCl_2$) を加えて細胞を定着させ、37℃ で 15 分間インキュベートする。定着溶液 1 を、5 ml の X-gal 溶液 1 l (0.2% の X-gal; 10 mM のリン酸ナトリウムバッファ (pH 7.0); 150 mM の NaCl; 1 mM の $MgCl_2$; 3.3 mM の $K_3Fe(CN)_6$) で置換し、プレート

を 37℃ で 30～60 分間インキュベートする。X-gal 溶液を除去し、2 ml の 70% グリセロールを各プレートに添加する。青色に染色された細胞を光学顕微鏡で確認する。

この方法は、MAC、特に抗 H1V メガ染色体をもつ MAC を導入して、抗 H

I V 活性マウスモデルを作製するために使用されるであろう。

実施例 1 4

(ヒト以外の) トランスジェニック動物

動物体に所望の形質、例えば疾病耐性を与えるヘテロログス遺伝子を発現する(ヒト以外の) トランスジェニック動物を作製し得る。疾病耐性動物のモデルとして役立つトランスジェニックマウスを作製する。ワクチンをコードしているかまたは治療用分子をコードしている遺伝子を胚または胚幹細胞(E S細胞)に導入して遺伝子産物を発現させ、特定の疾病に耐性または低感受性の動物を作製し得る。

哺乳類の人工メガ染色体及びその他の人工染色体、特にS A T A Cを使用して、病原性ウイルス耐性のような所望の形質を与える遺伝子を安定に発現させる哺乳類及び鳥類のような(ヒ

ト以外の) トランスジェニック動物を作製し得る。人工染色体はまた、免疫的にヒト化された異種移植用器官を作製するために、ブタのような(ヒト以外の) トランスジェニック動物を作製するために使用され得る。

例えば、抗H I Vリボザイムをコードするトランスジーンを含むトランスジェニックマウスは、これらの方法を用いて作製された安定な(ヒト以外の) トランスジェニック動物の有用な発育モデルである。(ヒト以外の) トランスジェニック動物、特に、乳汁中に有益なタンパク質を産生する雌牛、ヤギ、マウス、雄牛、ラタダ、ブタ及びヒツジ、卵中に治療用タンパク質または他の有益なタンパク質を産生するトランスジェニックニワトリ及び他の産卵性家禽、などが人工染色体を用いて作製され得る。例えば、乳汁中にヘテロログスDNAを発現させるために乳腺特異的プロモーターを使用することが公知である(例えば、米国特許第4, 8 7 3, 3 1 6号参照)。特に、乳汁特異的プロモーター、または好ましくは乳房組織中で特異的に活性化される乳汁特異的シグナルペプチドに連結されたプロモーターは有益なDNAに作動可能に連結され、これによって乳汁中でこのDNA配列を発現させる。

1. 抗HIVリボザイムを発現する対照トランスジェニックマウスの発育

ベクターに担持されたトランスジーンDNAを用いて発育させたマウス（対照マウス）中のトランスジーン発現と、人工メガ染色体に担持されたトランスジーンを用いて発育させたマウス中の発現との安定性及び量を比較するために対照トランスジェニックマウスを作製する。

a. β -ガラクトシダーゼを発現する対照トランスジェニックマウスの発育

β -ガラクトシダーゼ遺伝子を単独でマウス胚にマイクロインジェクションすることによって1組の対照トランスジェニックマウスを作製した。プラスミドDNAをマウス胚に導入するために使用したマイクロインジェクション手順は実施例13に記載の手順を胚を使用するように修正したものである（例えば、Hoganら（1994）*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 特にpp255-264及び付録3参照）。受

胎マウス肝（Charles River Co. から得られたCB6株）に、BamHI消化によって直鎖化しておいた1ngのプラスミドpCH110（Pharmacia）を注入した。このプラスミドは、SV40後期プロモーターに連結された β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含んでいる。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子産物は、トランスジーン発現の成否を知るための検出容易なマーカーを提供する。更に、これらの対照マウスは、プラスミドを胚に導入するために使用したマイクロインジェクション手順を追認する。更に、モデル系（下記参照）のマウス胚に導入されるメガ染色体が β -ガラクトシダーゼ遺伝子も含むので、pCH110の胚注入によって作製された対照トランスジェニックマウスは、プラスミドに由来のヘテロログス遺伝子の発現と人工染色体に担持された遺伝子に由来のヘテロログス遺伝子の発現とを比較するための相似的な系として役立つ。

注入後、胚が分裂して2細胞を形成するまで胚を改質HTF培地中で、5%CO₂下、37℃で1日間培養する。2細胞の胚を代理母となる雌マウスに移植する（手順に関しては、*Manipulating the Mouse Emb*

ryo, A

Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 127以降参照)。

b. 抗HIVリボザイムを発現する対照トランスジェニックマウスの発育

異なる3つの遺伝子、即ち、(1)抗HIVリボザイムをコードするDNAと、(2)ピューロマイシン耐性遺伝子と、(3)ヒグロマイシン耐性遺伝子とを含むプラスミドpCEPUR-132をマイクロインジェクションによってマウス胚に導入し1組の抗HIVリボザイム遺伝子含有対照トランスジェニックマウスを作製した。プラスミドpCEPUR-132は、抗HIVリボザイム遺伝子(以後、Changら(1990) Clin. Biotech. 2: 23-31に準じてリボザイムDと呼ぶ; 他の参考文献としてはRossiらの米国特許第5, 144, 019号、特に図4)とヒグロマイシン耐性遺伝子とを含むプラスミドpCEP-132の部分とピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpCEPURの部分に結合させることによって構築された。

プラスミドpCEP-132を以下の手順で構築した。ベクターpCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA; また、Yatesら(1985) Nature 313: 812-815参照)を、ベクターの多数クロニング部位領域を開裂するXhoIで消化した。この~10.4 kbのベクターは、チミジンキナーゼ遺伝子プロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたヒグロマイシン耐性遺伝子を含み、更にアンピシリン耐性遺伝子とColE1複製起点とEBNA-1 (エプスタイン・バールウイルス核抗原) 遺伝子とOriPを含む。サイトメガロウイルスプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルとが多数クロニング部位に隣接している。

XhoI消化したpCEP4を、プラスミド132 (このプラスミドの記述に関しては実施例4参照)のXhoI及びSalIによる消化によって得られたフラグメントに結合させた。このXhoI/SalIフラグメントは、3' 端にS

V40ポリアデニル化シグナルが連結された抗HIVリボザイム遺伝子を含んでいる。この結合によって得られたプラスミドをpCEP-132と命名した。従って詳細にはpCEP-132は、

抗HIVリボザイム遺伝子のCMVプロモーター駆動発現のために多数タローニング部位に挿入された抗HIVリボザイム遺伝子とSV40ポリアデニル化シグナルとを含むpCEP4から成る。

pCEPUR-132を作製するために、pCEP-132をpCEPURのフラグメントに結合させた。pCEPURは、pCEP4のNheI/NruI消化によって生じた7.7kbのフラグメントを、5'端にSV40プロモーターが連結されたピューロマイシン耐性遺伝子を含むpBabeの1.1kbのNheI/SnaBIフラグメントに結合させることによって調製した(pBabeの記述に関しては、Morgenstern and Land (1990) Nucleic Acids Res. 18:3587~3596参照)。従って、pCEPURは、pCEP4に由来のアンピシリン耐性遺伝子及びEBNA1遺伝子と、ColE1及びOriP要素と、pBabeに由来のピューロマイシン耐性遺伝子とから構成されている。pCEPUR中のピューロマイシン遺伝子の5'端にSV40プロモーター(pBabeに由来)が隣接し、3'端にSV40ポリアデニル化シグナル(pCEP4に由来)が隣

接している。

プラスミドpCEPURをXhoI及びSalIで消化し、5'端にSV40プロモーターが連結されたピューロマイシン耐性遺伝子を、XhoI消化したpCEP-132に結合させて、~12.1kbのプラスミドを作製し、pCEPUR-132と命名した。従って詳細にはpCEPUR-132は、XhoI部位に挿入されたピューロマイシン耐性遺伝子とSV40プロモーターとを含むpCEP-132から成る。pCEPUR-132の主要要素は、チミジンキナーゼプロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、CMVプロモーター及びSV40ポリアデニル化シグナルに連結された

抗HIVリボザイム遺伝子と、SV40プロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子とから成る。プラスミドはまた、アンピシリン耐性遺伝子及びEBNA1遺伝子とColE1複製起点及びOriPを含む。

(C57BL/6JxCBA/J) F1雄マウスと予め交配した (C57BL/6JxCBA/J) F1雌マウス (例えば、Manipulating the Mouse Embryo

o, A Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 429参照) から受精卵を調製した。これらのF2受精卵の雄性前核に、NruI消化によって直鎖化しておいたpCEPUR-132 (~3µg/ml) を注入した (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。注入を受けた卵を代理母となる雌マウスに移植し、トランスジェニック子孫を发育させた。

これらの一次キャリアの子孫の尾細胞から単離したDNA中のトランスジーン の存在を分析した (後述の手順)。尾細胞中にトランスジーンを含んでいた (しかし全身の細胞にトランスジーンを含まなくてもよい、即ちキメラでもよい) 7体のキャリアマウスを交配して非キメラまたは生殖系のヘテロ接合体を産生させ得る。ヘテロ接合体を更に交配してホモ接合体である

トランスジェニック子孫を産生させ得る。

2. 哺乳類人工染色体を用いるモデルトランスジェニックマウスの发育

受精マウス胚に、融合細胞系G3D5またはH1D3 (前出) から単離したメガ染色体 (1p1あたり0-1個の染色体を含む1-10p1の材料) を前述の手順で微量注入する。メガ染色体は本文中に記載の手順で単離する。どちらの細

胞系から単離したメガ染色体も、抗HIVリボザイム（リボザイムD）遺伝子とヒグロマイシン耐性遺伝子及びβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を含む。注入を受けた胚を发育させ、前述のようなトランスジェニックマウスを得る。

あるいは、メガ染色体含有細胞系G3D5*またはH1D3*を、マウス胚幹細胞（例えば、米国特許第5,453,357号参照、市販物質；他の参考文献としてManipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 253-289ページ）に、標準手順（例えば、Guid

e to Techniques in Mouse Development in Methods in Enzymology Vol. 25, Wassarman and De Pamphilis, eds. (1993), 803-932ページ参照）で融合させる。（また、（前出のような）マイクロセル手順を用いて単離メガ染色体を胚幹細胞に導入することも可能である）。幹細胞を線維芽細胞（例えば、ヒグロマイシン及びピューロマイシンに耐性のSTO線維芽細胞）の存在下で培養する。得られた融合細胞系の細胞はトランスジェン（即ち、抗HIVリボザイム遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子及びβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を担持するメガ染色体を含む。この細胞を次にマウス線維芽細胞に移植し、次いで代理母となる雌マウスに移植して发育させ、トランスジェニックマウスを得る。

この方法によって作製されたマウスはキメラである。トランスジェンの発現はマウスのいくつかの領域、例えば、頭部に限定され、従って全部の細胞で発現されることはない。

3. トランスジェン発現用トランスジェニックマウスの分析

上述のように作製したトランスジェニックマウスが3～4週

齢に成長したときに、发育場所である胚（または受精卵）に導入されたトランス

ジーンの安定な発現を分析する。以下のような複数の方法でトランスジェニックマウスを分析し得る。

a. トランスジェニックマウスから得られた細胞の分析

トランスジェニックマウスから細胞サンプル（例えば、脾臓、肝臓及び腎臓の細胞、リンパ球、尾細胞）を採取する。どの細胞を用いてトランスジーン発現を試験してもよい。しかしながら、メガ染色体含有細胞を受精卵にマイクロインジェクションするかまたは胚幹細胞と融合させることによって作製したキメラマウスの場合、トランスジーンを担持する領域のマウス細胞だけがトランスジーンを発現すると予想される。細胞がヒグロマイシン（細胞が2つの抗生物質耐性遺伝子の導入によって作製されたマウスに由来する場合にはヒグロマイシンとピューロマイシンまたはネオマイシン）上で増殖を維持する場合、この増殖維持は、これらの細胞がトランスジーンを安定に発現しているという指標となる。標準方法に従って細胞から単離したRNAをノーザンブロット手順によって分析し、細胞が、抗生物質耐性遺伝子に基づく核酸プローブにハイブリダイズする転写物を発現するか否かを判断し得る。更に、トランスジェニック

マウスから得られた細胞による β -ガラクトシダーゼ発現の分析は、このマーカー酵素用の標準アッセイ（例えば、 β -ガラクトシダーゼ及びX-gal基質が関与する反応の産物の直接染色、例えば、Jones (1986) EMBO 5 : 3133-3142、または β -ガラクトシダーゼ活性の測定、例えばMiller (1972) Experiments in Molecular Genetics pp. 352-355, Cold Spring Harbor Press参照）を用いて行くとよい。特に、胚に導入されたトランスジーンが β -ガラクトシダーゼ遺伝子だけであるような対照トランスジェニックマウスから得られた細胞中のトランスジーン発現を評価するときは、 β -ガラクトシダーゼ発現の分析を使用する。

トランスジェニックマウスから得られた細胞中の抗HIVリボザイム遺伝子の安定な発現は複数の方法で評価できる。第一の方法では、標準手順に従って細胞から単離したDNAを、リボザイム遺伝子配列に対応するプライマーを用いて核

酸増幅する。遺伝子が細胞に含まれているとき、反応混合物とリボザイム遺伝子配列に基づく核酸プローブとのハイブリダイゼーション

ンによって所定のサイズの増幅産物が検出される。更に、このような核酸プローブに対するハイブリダイゼーションについて、細胞から単離したDNAをサザンブロット法を用いて分析してもよい。第二の方法では、細胞がリボザイム遺伝子に基づく核酸プローブにハイブリダイズするRNAを発現するか否かを判断するために、細胞から単離したRNAをノーザンブロットハイブリダイゼーションで処理し得る。第三の方法では、例えば、Changら(1990) Clin. Biotech. 2:23-31に記載されているように、細胞中の抗HIVリボザイム活性の存在を分析し得る。この分析では、細胞から単離したRNAを、放射性標識したHIV gagターゲットRNAと混合する。このターゲットRNAは、Changら(1990) Clin. Biotech. 2:23-31に記載のようなgagターゲットのin vitro開裂に有利な反応条件下でgag遺伝子鋳型のin vitro転写によって得られる。反応の停止後、完全鋳型よりもサイズの小さい開裂産物が検出されるか否かを判断するために混合物をゲル電気泳動によって分析する。このような開裂フラグメントの存在は安定に発現されたリボザイムの存在の指標となる。

b. 完全トランスジェニックマウスの分析

抗HIVリボザイム遺伝子(並びに選択及びマーカー遺伝子)を胚または受精卵に導入することによって作製した完全トランスジェニックマウスにおけるトランスジーンの発現は、マウスをHIV感染で攻撃することによってを分析し得る。高生産性HIV感染U937細胞(例えば、Locardiら(1992) J. Virol. 66:1649-1654参照)の腹膜組織内注入によってマウスをHIV感染させることが可能である。感染の成否は、HTV感染ヒト細胞を注入したトランスジェニックマウスから得られた末梢血単核細胞のような細胞から単離したDNAの分析によって確認し得る。例えば、HIV特異的プライマーを用いる核酸増幅によって証明されるように、感染トランスジェニックマウス細

胞のDNAはHIV特異的gag及びenv配列を含むであろう。細胞が抗HIVリボザイムも安定に発現させているならば、細胞のRNA抽出物を分析したときに、リボザイムによるgag転写物の開裂によって生じた短縮gagフラグメントが検出されるであろう。

更に、抗HIVリボザイム遺伝子を担持するトランスジェニックマウスを、ヒトCD4（即ち、HIVの細胞性レセプター）

（ヒトCD4を発現するトランスジェニックマウスの記述に関してはGillespieら（1993）Mol. Cell. Biol. 13:2952-2958; Hannaら（1994）Mol. Cell. Biol. 14:1084-1094;及びYeungら（1994）J. Exp. Med. 180:1911-1920参照）を発現するトランスジェニックマウスと交配し得る。CD4及び抗HIVリボザイムの双方のトランスジーンを発現するこれらの交配トランスジェニックマウスの子孫は、（抗HIVリボザイムを発現することなく）CD4を単独に発現するマウスよりも（細胞中の活性HIVレベルが低下した結果）感染に対して耐性であるに違いない。

4. 人工染色体を用いるトランスジェニックニワトリの発育

トランスジェニックニワトリの発育は、商業的に重要な農畜産品種である家禽を病気耐性遺伝子及び治療用タンパク質をコードする遺伝子によって改良するなどの多くの用途を有している。この分野では、トランスジェニックニワトリの作製を目指す研究が、ランダム導入によってレシピエント細胞に遺伝子を導入する従来の方法でニワトリ細胞にトランスジーンを安定に発現させることが難しいという問題に直面していた。人工染色

体は、宿主細胞中でトランスジーンを安定に維持させるので、トランスジェニックニワトリの発育に特に有用である。

a. レシピエントニワトリ細胞にトランスジーンを導入するための人工染色体の調製

（i）哺乳類人工染色体

本文中に記載のSATAC及びミニクロモソームのような哺乳類人工染色体は、検出可能なリポーター遺伝子及び／またはトランスジェニックニワトリの発育に使用される有益なトランスジーンを取込むように修飾され得る。あるいは、本文中に記載の方法を使用してニワトリ特異的人工染色体を構築し得る。より特定のには、本文中に記載のMACの作製方法を用いてニワトリ人工染色体(CAC)を調製し得る。また、上述のように、本発明によって提供されるMACにニワトリライブラリーを導入し、得られたMACをニワトリ細胞に導入し、ニワトリ細胞中で機能性のMACを選択し得る。

実施例4及び7並びに本文の他の箇所で記載したように、人工染色体を含むマウスLMTK-由来の細胞系またはミニクロモソームを含む細胞系とそのハイブリッドに、選択されたDNAをトランスフェクトし、DNA内部に含まれているヘテロ

ガス遺伝子を機能的に発現させる外来DNAを組み込んだMAC(またはCAC)を作製し得る。

ニワトリ細胞中で発現させるべきトランスジーンを含むMACまたはCACを作製するために、MAC含有細胞系に、λDNAとニワトリ細胞中の遺伝子発現を駆動し得るプロモーターに作動可能に連結された有益なトランスジーンとを含むDNAをトランスフェクトし得る。あるいは、上述のように作製したミニクロモソームまたはMAC(またはCAC)を単離し、細胞に導入し、次いで選択されたDNAのターゲット化組み込みを行うとよい。ターゲット化組み込み用のペクターは本発明によって提供されるかまたは本文中に記載の手順で構築され得る。

有益なプロモーターは、ニワトリ細胞中の遺伝子発現を促進するために当業界で公知の構成性、誘発性の組織(または細胞)特異的プロモーターである。例えば、ニワトリ胎胚葉性細胞及び初代ニワトリ線維芽細胞中のIacZ遺伝子の発現が、マウス熱ショックタンパク質68(hsp68)プロモーター(phspPTIacZpA; Brazolotら(1991) Mol. Reprod. Devel. 30:304-312参照)、Zn2+誘発性ニワトリメタロチオネイン(cMt)プロモ-

ター (pCBcMtlacz; Brazolotら (1991) Mol. Reprod. Devel. 30:304-312参照)、タンデム配置のラウス肉腫ウイルス及びニワトリ β -アクチンプロモーター (pmiwZ; Brazolotら (1991) Mol. Reprod. Devel. 30:304-312参照)、構成性サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを用いて証明された。本発明に特に有益なプロモーターは、卵白アルブミン及びビリゾチームのような卵中で発現される遺伝子に由来の卵特異的プロモーターである。

プロモーターの選択は、種々の要因、例えば、トランスジーン産物をトランスジェニックニワトリの全身で発現させるべきかまたは卵のような特定場所に限定するべきかなどの要因に左右される。ニワトリ体内で機能性の細胞特異的プロモーターとしては、卵白アルブミンタンパク質をコードする遺伝子のステロイド応答性プロモーター (Gauba (1987) EMBO J. 6:2313-2320; Torara (1988) EMBO J. 7:3771-3778; Parkら (1995) Biochem. Mol. Biol. Int. (Australia) 36:811-816) がある。

(ii) ニワトリ人工染色体

更に、ニワトリ人工染色体を本文中に記載の方法を用いて作製し得る。例えば、初代ニワトリ線維芽細胞 (例えば、Brazolotら (1991) Mol. Reprod. Devel. 30:304-312) のようなニワトリ細胞に、選択可能マーカー (例えば、抗生物質耐性を与えるタンパク質) をコードし且つ導入DNAを内在性ニワトリ染色体の動原体周囲領域にターゲットするDNA (例えばニワトリサテライトDNA) を含むDNAをトランスフェクトするとよい。次に、選択培地で増殖を維持するトランスフェクタントを本文中に記載の方法を用いて分析し、ミニクロモソーム及び特にSATACのような人工染色体の有無を判定する。次に、人工染色体含有トランスフェクタント細胞に、有益なトランスジーン (適当なプロモーターに融合) をコードするDNAを、外来DNAをニワトリ人工染色体にターゲットするDNAと共にトランスフェクトする。

b. 有益なトランスジーンを担持する人工染色体のレシピエントニワトリ細胞内

導入

染色体をレシピエント細胞に導入するために、有益な（1つまたは複数の）トランスジーンを担持している人工染色体を含

む細胞系（即ち、ドナー細胞）をレシピエントニワトリ細胞に融合し得る。あるいは、例えば本文中に記載の方法（例えば実施例10参照）を用いて人工染色体をドナー細胞から単離し、レシピエント細胞に直接導入してもよい。

代表的なニワトリレシピエント細胞系の非限定例は、X期胞胚葉細胞（例えば、Brazolotら（1991）Mol. Reprod. Dev. 30:304-312; Etchesら（1993）Poultry Sci. 72:882-889; Petittら（1990）Development 108:185-189参照）及びニワトリ受精卵（例えば、Loveら（1994）Biotechnology 12:60-63参照）である。

例えば、マイクロセル融合は、人工染色体を鳥類細胞に導入するための1つの方法である（マイクロセルをDT40ニワトリプレB細胞と融合させる方法に関しては例えば、Diekenら（1996）Nature Genet. 12:174-182参照）。この方法では、人工染色体含有細胞系からマイクロセルを調製し（例えば、実施例1. A. 5に記載の手順を用いる）、ニワトリレシピエント細胞に融合させる。

単離した人工染色体を、リポフェクション手順（例えば、Brazolotら（1991）Mol. Reprod. Dev. 30:304-312参照）のような脂質仲介キャリア系を介してニワトリレシピエント細胞系に直接導入してもよく、または直接マイクロインジェクションを使用してもよい。人工染色体をニワトリ受精卵に導入する場合には概してマイクロインジェクションが好ましい（例えば、Loveら（1994）Biotechnology 12:60-63参照）。

c. トランスジェニックニワトリの発育

レシピエント細胞として（人工染色体を受容した）X期胞胚葉細胞を同じ発生

期の胚に注入することによってトランスジェニックニワトリを発育させ得る（例えば、Etchesら（1993）Poultry Sci. 72:882-889；Petititeら（1990）Development 108:185-189；Carsienceら（1993）Development 117:669-675参照）。卵殻内のレシピエントニワトリ胚を明りに透かして良否を判定して孵化させ、いずれかの細胞が（1つまたは複数の）トランスジーンを発現している生殖系キメラニワトリを産生させる。

あるいは、例えば直接マイクロインジェクションによって（例えば、Loveら（1994）Biotechnology 12:60-63参照）、人工染色体をニワトリ受精卵に直接導入してもよい。この場合、人工染色体はニワトリの細胞の少なくとも一部分に取込まれる。卵特異的プロモーターのような組織特異的プロモーターを組み込むことによって、作動可能に連結されたヘテロログスDNAの適正な発現が確保される。

また、本発明で提供される方法によって有益なDNAをミニクロモソームに導入してもよい。ミニクロモソームは本発明によって提供されるものでもよく、または本文中に記載の方法を用いてニワトリ細胞中で作製したものでもよい。ヘテロログスDNAは、本発明で提供されるかまたは本発明の方法によって構築されたターゲッティングベクターを用いて導入される。

いくつかの変形は当業者に自明であると考えられるので、本発明の範囲は請求の範囲の記載のみに限定されることを理解されたい。

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 2 9 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセディカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列の特徴 :

配列 :

GAATTCATCA	TTTTTCANGT	CCTCAAGTGG	ATGTTTCTCA	TTTNCCATGA	TTTAAAGTTT	60
TCTCGCCATA	TTCTGGTCC	TACAGTGTGC	ATTCTCCAT	TTTNCACGTT	TTNCAGTGAT	120
TTCGTCATTT	TCAAGTCCTC	AAGTGGATGT	TTCTCATTTN	CCATGAATTT	CAGTTTCTN	180
GCCATATTCC	ACGTCCTACA	GNGGACATTT	CTAAATTINC	CACCTTTTTC	AGTTTTCCTC	240
GCCATATTTT	ACGTCCTAAA	ATGTGTATTT	CTCGTTTNCC	GTGATTTTCA	GTTTTCTCGC	300
CAGATTCAG	GTCTATAAT	GTGCATTTCT	CATTTNNCAC	GTTTTTCAGT	GATTTCTGCA	360
TTTTTTCAAG	TCGGCAAGTG	GATGTTTCTC	ATTTNCCATG	ATTTNCAGTT	TTCTTGNAAAT	420
ATTCCATGTC	CTACAATGAT	CATTTTAAAT	TTTCCACCTT	TTCATTTTTC	CACGCCATAT	480

TTCATGTCCT	AAAGTGTATA	TTTCTCCTTT	TCCGCGATTT	TCAGTTTTCT	CGCCATATTC	540
CAGGTCCTAC	AGTGTGCATT	CCTCATTTTT	CACCTTTTTC	ACTGATTTTC	TCATTTTTCA	600
AGTCGTCAAC	TGGATCTTTC	TAATTTTCCA	TGATTTTCAG	TTATCTTGTC	ATATTCCATG	660
TCCTACAGTG	GACATTTCTA	AATTTTCCAA	CTTTTTC AAT	TTTTCTCGAC	ATATTGACG	720
TGCTAAAGTG	TGTATTTCTT	ATTTTCCGTG	ATTTTCAGTT	TTCTCGCCAT	ATTCCAGGTC	780
CTAATAGTGT	GCATTTCTCA	TTTTTCACGT	TTTTCAGTGA	TTTCGTCAAT	TTTTCAGTT	840
GTCAAGGGGA	TGTTTCTCAT	TTTCCATGAG	TGTCAGTTT	CTTGCTATAT	TCCATGTCCT	900
ACAGTGACAT	TTCTAAATAT	TATACCTTTT	TCAGTTTTTC	TCACCATATT	TCACGTCCTA	960
AAGTATATAT	TTCTCATTTT	CCCTGATTTT	CAGTTTCCTT	GCCATATTC	AGGTCCTACA	1020
GTGTGCATTT	CTCATTTTTC	ACGTTTTTCA	GTAATTTCTT	CATTTTTTAA	GCCCTCAAAT	1080
GGATGTTTCT	CATTTTCCAT	GATTTTCAGT	TTTCTTGCCA	TATACCAIGT	CCTACAGTGG	1140
ACATTTCTAA	ATTATCCACC	TTTTTCAGTT	TTTCATCGGC	ACATTTACAG	TCCTAAAGTG	1200
TGTATTTCTA	ATTTTCAGTG	ATTTTCAGTT	TTCTCGCCAT	ATTCCAGGAC	CTACAGTGTC	1260
CATTTCTCAT	TTTTTCACGTT	TTTTCAGTGAA	TTC			1293

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 0 4 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列の特徴 :

配列 :

AGGCC	TATGG	TGAAAA	AGGA	AATATCT	TCC	CCTGAAA	ACT	AGACAGA	AAG	ATTCTCAGAA	60
TCTTAT	TTTGT	GATGTG	CGCC	CCTCAAC	TAA	CAGTGT	TGAA	GCTTTCT	TTTT	GATAGAGCAG	120
TTTTG	AAACA	CTCTTT	TTGT	AAAATCT	GC	AGAGG	ATAT	TGGATAG	C	TGAGGATTT	180
CGTTG	GAAC	GGGATT	GTCT	TCATATA	AAAC	CCTAGAC	CAGA	AGCAT	TCTCA	GAAGCTTCAT	240
TGGGAT	G	CAGTTG	AAGT	CACAGT	GTG	AACAGT	C	TTTCA	TAGAG	CAGGTTTGAA	300
ACACTC	TTTT	TTGTAG	TATC	TGGAAG	TGGA	CATT	TGGAGC	GATCTC	CAGGA	CTGCGGTGAA	360
AAAGG	AAATA	TC	TCCAATA	AAAGCT	AGAT	AGAGG	CAATG	TCAGAAA	ACCT	TTTTCATGAT	420
GTATCT	ACTC	AGCTA	ACAGA	GTTGA	ACCTT	CCTTTG	AGAG	AGCAGT	TTTG	AAACACTCTT	480
TTTGT	GGAAT	CTGCA	AGTGG	ATATTT	TGTCT	AGCTTT	GAGG	ATTTCG	TTGG	GAAACGGGAT	540
TACAT	ATAAA	AAGCAG	ACAG	CAGCAT	TCCC	AGAAA	CTTCT	TTGTG	ATGTT	TGCATTCAAG	600
TCACAG	AGTT	GAACAT	TCCC	TTTCAT	AGAG	CAGGTT	TGAA	ACACAC	TTTT	TGATGTATCT	660
GGATG	TGGAC	ATTTC	CAGCG	CTTTC	AGGCC	TAAGGT	GAAA	AGGAA	ATATC	TTCCCCTGAA	720
AAC	TAGACAG	AAGCAT	TCTC	AGAAA	CTTAT	TTGTG	ATGTG	CGCCCT	CAAC	TAACAGTGTT	780
GAAGC	TTTCT	TTTGAT	AGAG	GCAGT	TTTGA	AACACT	CTTT	TGTGG	AATCT	GCAAGTGGAT	840
ATTTG	TCTAG	CTTTG	AGGAT	TTCTT	TGGAA	ACGGG	ATTAC	ATATA	AAAAAG	CAGACAGCAG	900
CATTCC	CAGA	ATCTT	GTTTG	TGATG	TTTGC	ATTC	AAGTCA	CAGAGT	TGAA	CATTC	960
CAGAG	AGCAG	GTTTGA	ACAC	TC	TTTTATA	GTATCT	G	GTGGAC	ATTT	GGAGCGCTTT	1020
CAGGG	GGGAT	CCTCT	AGAA	T	TCCT						1044

配列番号 : 3

配列の長さ : 2 4 9 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

ハイボセティカル : No

アンチセンス : No

フラグメント型 :

起源 :

配列の特徴 :

配列 :

CTGCAGCTGG	GGGTCTCCAA	TCAGGCAGGG	GCCCCCTTACT	ACTCAGATGG	GGTGGCCGAG	60
TAGGGGAAGG	GGGTGCAGGC	TGCATGAGTG	GACACAGCTG	TAGGACTACC	TGGGGGCTGT	120
GGATCTATGG	GGGTGGGGAG	AAGCCCAAGT	ACAGTGCCTA	GAAGAGACAA	GGTGGCCCTGA	180
GAGGGTCTGA	GGAAACATAGA	GCTGGCCATG	TTGGGGCCAG	GTCTCAAGCA	GGAAGTGAGG	240
AATGGGACAG	GCTTGAGGAT	ACTCTACTCA	GTAGCCAGGA	TAGCAAGGAG	GGCTTGGGGT	300
TGCTATCCTG	GGGTTC AAC	CCCCAGGTTG	AAGGCCCTGG	GGGAGATGGT	CCCAGGACAT	360
ATTACAATGG	ACACAGGAGG	TTGGGACACC	TGGAGTCACC	AAACAAAACC	ATGCCAAGAG	420
AGACCATGAG	TAGGGGTGTC	CAGTCCAGCC	CTCTGACTGA	GCTGCATTGT	TCAAATCCAA	480
AGGGCCCCCTG	CTGCCACCTA	GTGGCTGATG	GCATCCACAT	GACCCTGGGC	CACACGCGTT	540
TAGGGTCTCT	GTGAAGACCA	AGATCCTTGT	TACATTGAAC	GACTCCTAAA	TGAGCAGAGA	600
TTTCCACCTA	TTCGAAACAA	TCACATAAAA	TCCATCCCTGG	AAAAAGCCTG	GGGGATGGCA	660
CTAAGGCTAG	GGATAGGGTG	GGATGAAGAT	TATAGTTACA	GTAAGGGGTT	TAGGGTTAGG	720
GATCAACGTT	GGTTAGGAGT	TAGGGATACA	GTAGGGTACC	GCTAGGGTTA	GGGGTTAGGG	780
TTAGGCGTTA	GGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGGTTAGGG	GTTAGGGTTA	840
GGGTAGGTT	TTGGGGTGGC	GTATTTTGGT	CTTATACGCT	GTGTTCCACT	GGCAATGAAA	900
AGAGTTCTTG	TTTTCCTTC	AGCAATTTGT	CATTTTTTAA	AGAGTTTAGC	AATTTCTACA	960
GATATAGACC	AGCTGTGCTA	TCTCATTGTG	GTTTTCAATT	GTAACCACAT	TGTGGTTTCA	1020
ATGTGTTTAC	TTGCCATCTG	TAGATCTTCT	TTGCGTGAGG	TGTCTGTTCA	GATGTGTGTG	1080
CATTTCTTGN	NTTNGGCTG	TTTAACTTAT	TGTTTAGTTT	TAATAATTTT	TTATATATTT	1140
GAAGACAAAT	CTTTCTCAGA	TGTGTATTTG	CAAATATTTT	TTCAATATGA	GGCTTGCTTT	1200
TGTTCTTAAC	AAGGTCTCTT	CAGAGATAAC	TTAAATATAA	GAAATCCACA	CTGTCACTTC	1260
TTTTGTGTAT	ATCTACCTTT	TGTGTCATTT	GTAAAAATTC	ATTACCAAC	CCAAAGGCAG	1320
ATAGCTTTTC	TTCTATTGTT	TCTTCTAGAA	ATTTGTATAG	TTTTGCATTT	TTAGTGTAA	1380
GATGATTTTG	AGTGATTATT	TGTGTAAGTT	GTAAAGTTTT	CGTCTATATC	CATATCATTT	1440
CTTATGGTTT	CCAATTAATC	GTTCCCTCAC	TATTTTTTGG	AAAGACACAG	GATAGTGGGC	1500
TTTGTTAGAG	TAGATAGGTA	GCTAGACATG	AAAGAGGGG	GGCCTCCTGG	AAAAGGGA	1560
GTCTGGGAAG	GCTCACCTGG	AGGACCACCA	AAAATTCACA	TATTAGTAGC	ATCTCTAGTG	1620
CTGGAGTGGA	TGGGCACTTG	TCAATTGTGG	GTAGGAGGGA	AAAGAGGTCC	TATGCAGAAA	1680
GAAGCTCCCT	AGAAGTCCCT	TGAAGATGCC	CCAATCATTC	ACTCTGCAAT	AAAAATGTCA	1740
GAATATTGCT	AGCTACATGC	TGATAAGGNN	AAAGGGGACA	TTCTTAAGTG	AAACCTGGCA	1800
CCATAAGTAC	AGATTAGGGC	AGAGAAGGAC	ATTCAAAAAG	GGCAGGCGCA	GTAGGTACAA	1860
ACGTGATCGC	TGTCAGTGTG	CCTGGGATGG	CGGGAAGGAG	GCTGGTGCCA	GAGTGGATTC	1920
GTATTGATCA	CCACACATAT	ACCTCAACCA	ACAGTGAGGA	GGTCCCACAA	GCCTAAGTGG	1980
GGCAAGTTGG	GGAGCTAAGG	CAGTAGCAGG	AAAACCAAGC	AAAGAAAACA	GGTGGAGACT	2040
TGAGACAGAG	GCAGGAATGT	GAAGAAATCC	AAAATAAAAT	TCCCTGCACA	GGACTCTTAG	2100
GCTGTTTAA	GCATCGCTCA	GTCCCACTCC	TCCCTATTTT	TCTACAATAA	ACTCTTTACA	2160
CTGTGTTTCT	TTTCAATGAA	GTTATCTGCC	ATCTTTGTAT	TGCCTCTTGG	TGAAAATGTT	2220
TCTTCCAAGT	TAAACAAGAA	CTGGGACATC	AGCTCTCCCC	AGTAATAGCT	CCGTTTCAGT	2280
TTGAATTTAC	AGAAGTGTAT	GGCTTAATAA	CTGGCGCTCT	GACTTTAGTG	GTGCAGGAGG	2340
CCGTCAACCC	GGGACCAAGA	GTGCCCTGCC	TAGTCCCCAT	CTGCCCCGAG	GTGGCGGCTG	2400
CCTCGACACT	GACAGCAATA	GGGTCCGGCA	TGTCCCCCAG	CTGCCAGCAG	GGGGCGTACG	2460
ACGACTACAC	TGTGAGCAAG	AGGGCCCTGC	AG			2492

配列番号：4

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

GGGGAATTCA TTGGGATGTT TCAGTTGA

28

配列番号：5

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：G e n o m i c D N A

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

CGAAAGTCCC CCCTAGGAGA TCTTAAGGA

29

配列番号：6

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：RNA

ハイボセディカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

CCGCTTAATA CTCTGATGAG TCCGTGAGGA CGAAACGCTC TCGCACC 47

配列番号：7

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

CGATTTAAAT TAATTAAGCC CGGGC

25

配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列の特徴 :

配列 :

TAAATTTAAT TAATTCGGGC CCGTCGA

27

配列番号 : 9

配列の長さ : 6 9

配列の型 : 核 酸

鎖の数 : 一 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

他の情報 : I L - 2 シグナル配列

配列 :

ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA CTA AGT CTT GCA CTT
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

48

GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr

69

配列番号：10

配列の長さ：945

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：

配列の特徴：

特徴を表す記号：コーディング配列

存在位置：1...942

他の情報：Renilla Reinformis ルシフェ
ラーゼ

公開情報：米国特許第5,418,155号

配列：

AGC Ser 1	TTA Leu	AAG Lys	ATG Met	ACT Thr 5	TCG Ser	AAA Lys	GTT Val	TAT Tyr	GAT Asp 10	CCA Pro	GAA Glu	CAA Gln	AGG Arg	AAA Lys 15	CGG Arg	48
ATG Met	ATA Ile	ACT Thr 20	GGT Gly	CCG Pro	CAG Gln	TGG Trp	TGG Trp	GCC Ala 25	AGA Arg	TGT Cys	AAA Lys	CAA Gln	ATG Met 30	AAT Asn	GTT Val	96
CTT Leu	GAT Asp	TCA Ser 35	TTT Phe	ATT Ile	AAT Asn	TAT Tyr	TAT Tyr 40	GAT Asp	TCA Ser	GAA Glu	AAA Lys	CAT His 45	GCA Ala	GAA Glu	AAT Asn	144
GCT Ala 50	GTT Val	ATT Ile	TTT Phe	TTA Leu	CAT His	GGT Gly 55	AAC Asn	GCG Ala	GCC Ala	TCT Ser	TCT Ser	TAT Tyr	TTA Leu	TGG Trp	CGA Arg	192
CAT His 65	GTT Val	GTG Val	CCA Pro	CAT His 70	ATT Ile	GAG Glu	CCA Pro	GTA Val	GCG Ala	CGG Arg 75	TGT Cys	ATT Ile	ATA Ile	CCA Pro	GAT Asp 80	240
CTT Leu	ATT Ile	GGT Gly	ATG Met	GGC Gly 85	AAA Lys	TCA Ser	GGC Gly	AAA Lys	TCT Ser 90	GGT Gly	AAT Asn	GGT Gly	TCT Ser	TAT Tyr 95	AGG Arg	288
TTA Leu	CTT Leu	GAT Asp	CAT His 100	TAC Tyr	AAA Lys	TAT Tyr	CTT Leu	ACT Thr 105	GCA Ala	TGG Trp	TTG Leu	AAC Asn	TTC Phe 110	TTA Leu	ATT Ile	336
TAC Tyr	CAA Gln	AGA Arg 115	AGA Arg	TCA Ser	TTT Phe	TTT Phe	GTC Val 120	GGC Gly	CAT His	GAT Asp	TGG Trp	GGT Gly 125	GCT Ala	TGT Cys	TTG Leu	384
GCA Ala 130	TTT Phe	CAT His	TAT Tyr	AGC Ser	TAT Tyr	GAG Glu 135	CAT His	CAA Gln	GAT Asp	AAG Lys	ATC Ile 140	AAA Lys	GCA Ala	ATA Ile	GTT Val	432
CAC His 145	GCT Ala	GAA Glu	AGT Ser	GTA Val	GTA Val 150	GAT Asp	GTG Val	ATT Ile	GAA Glu	TCA Ser 155	TGG Trp	GAT Asp	GAA Glu	TGG Trp	CCT Pro 160	480
GAT Asp	ATT Ile	GAA Glu	GAA Glu	GAT Asp 165	ATT Ile	GCG Ala	TTG Leu	ATC Ile	AAA Lys 170	TCT Ser	GAA Glu	GAA Glu	GGA Gly	GAA Glu	AAA Lys 175	528
ATG Met	GTT Val	TTG Leu	GAG Glu 180	AAT Asn	AAC Asn	TTC Phe	TTC Phe	GTG Val 185	GAA Glu	ACC Thr	ATG Met	TTG Leu	CCA Pro 190	TCA Ser	AAA Lys	576
ATC Ile	ATG Met	AGA Arg 195	AAG Lys	TTA Leu	GAA Glu	CCA Pro	GAA Glu 200	GAA Glu	TTT Phe	GCA Ala	GCA Ala	TAT Tyr 205	CTT Leu	GAA Glu	CCA Pro	624

TTC AAA GAG AAA GGT GAA GTT CGT CGT CCA ACA TTA TCA TGG CCT CGT	672
Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg	
210 215 220	
GAA ATC CCG TTA GTA AAA GGT GGT AAA CCT GAC GTT GTA CAA ATT GTT	720
Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val	
225 230 235 240	
AGG AAT TAT AAT GCT TAT CTA CGT GCA AGT GAT GAT TTA CCA AAA ATG	768
Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met	
245 250 255	
TTT ATT GAA TCG GAT CCA GGA TTC TTT TCC AAT GCT ATT GTT GAA GGC	816
Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly	
260 265 270	
GCC AAG AAG TTT CCT AAT ACT GAA TTT GTC AAA GTA AAA GGT CTT CAT	864
Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His	
275 280 285	
TTT TCG CAA GAA GAT GCA CCT GAT GAA ATG GGA AAA TAT ATC AAA TCG	912
Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser	
290 295 300	
TTC GTT GAG CGA GTT CTC AAA AAT GAA CAA TAA	945
Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln	
305 310	

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列の特徴：

配列：

TTTGAATTCA TGTACAGGAT GCAACTCCTG

30

配列番号：12

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

TTTGAATTCA GTAGGTGCAC TGTTTGTAC

30

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 1 4 3 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

CCTCCACGCA	CGTTGTGATA	TGTAGATGAT	AATCATTATC	AGAGCAGCGT	TGGGGGATAA	60
TGTCGACATT	TCCACTCCCA	ATGACGGTGA	TGTATAATGC	TCAAGTATTC	TCCTGCTTTT	120
TTACCACTAA	CTAGGAAC TG	GGTTTGCCCT	TAATTCAGAC	AGCCTTGGCT	CTGTCTGGAC	180
AGGTCCAGAC	GACTGACACC	ATTAACACTT	TGTCAGCCTC	AGTGACTACA	GTCATAGATG	240
AACAGGCCTC	AGCTAATGTC	AAGATACAGA	GAGGTCTCAT	GCTGGTTAAT	CAACTCATAG	300
ATCTTGTTCCA	GATACAACTA	GATGTATTAT	GACAAATAAC	TCAGCAGGGA	TGTGAACAAA	360
AGTTTCCGGG	ATTGTGTGTT	ATTTCCATT C	AGTATGTTAA	ATTTACTAGG	ACAGCTAATT	420
TGTCAAAAAG	TCTTTTTCAG	TATATGTTAC	AGAATTGGAT	GGCTGAATTT	GAACAGATCC	480
TTCGGGAATT	GAGACTTCAG	GTCAACTCCA	CGCGCTTGG A	CCTGTCGCTG	ACCAAAGGAT	540
TACCCAATTG	GATCTCCTCA	GCATTTTCTT	TCTTTAAAAA	ATGGGTGGGA	TTAATATTAT	600
TTGGAGATAC	ACTTTGCTGT	GGATTAGTGT	TGCTTCTTTG	ATTGGTCTGT	AAGCTTAAGG	660
CCCAAAC TAG	GAGAGACAAG	GTGGTTATTG	CCCAGGCGCT	TGCAGGACTA	GAACATGGAG	720
CTTCCCCTGA	TATATGGTTA	TCTATGCTTA	GGCAATAGGT	CGCTGGCCAC	TCAGCTCTTA	780
TATCCCACGA	GGCTAGTCTC	ATTGTACGGG	ATAGAGTGAG	TGTGCTTCAG	CAGCCCCGAG	840
GAGTTGCAAG	GCTAAGCACT	GCAATGGAAA	GGCTCTGCGG	CATATATGTG	CCTATTCTAG	900
GGGGACATGT	CATCTTTCAT	GAAGGTT CAG	TGTCCTAGTT	CCCTTCCCCC	AGGCAAAACG	960
ACACGGGAGC	AGGTCAGGGT	TGCTCTGGGT	AAAAGCCTGT	GAGCCTGGGA	GCTAATCCTG	1020
TACATGGCTC	CTTACCTAC	ACACTGGGGA	TTTGACCTCT	ATCTCCACTC	TCATTAATAT	1080
GGGTGGCCIA	TTTGCTCTTA	TTAAAAGGAA	AGGGGGAGAT	GTTGGGAGCC	GCGCCACAT	1140
TCGCCGTTAC	AAGATGGCGC	TGACAGCTGT	GTTCTAAGTG	GTAAACAAAT	AACTGCGCA	1200
TGTGCCGAGG	GTGGTTCTTC	ACTCCATGTG	CTCTGCCTTC	CCCGTGACGT	CAACTCGGCC	1260
GATGGGCTGC	AGCCAATCAG	GGAGTGACAC	GTCCTAGGCG	AAGGAGAATT	CTCCTTAATA	1320
GGGACGGGGT	TTCGTTCTCT	CTCTCTCTCT	TGCTTCTCTC	TCTTGCTTTT	TCGCTCTCTT	1380
GCTTCCCGTA	AAGTGATAAT	GATTATCATC	TACATATCAC	AACGTGCCTG	GAGG	1434

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 1 4 0 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

CCTCCACGCA	CGTTGTGATA	TGTAGATGAT	AATCATTATC	AGAGCAGCGT	TGGGGGATAA	60
TGTCGACATT	TCCACTCCCA	ATGACGGTGA	TGTATAATGC	TCAAGTATTC	TCCTGCTTTT	120
TTACCACTAA	CTAGGAACGT	GGTTTGGCCT	TAATTCAGAC	AGCCTTGGCT	CTGTCTGGAC	180
AGGTCCAGAT	ACAACTAGAT	GTATTATGAC	AAATAACTCA	GCAGGGATGT	GAACAAAAGT	240
TTCCGGGATT	GCGTGTTATT	TCCATCCAGT	ATGTTAAATT	TACTAGGGCA	GCTAATTGT	300
CAAAAAGTCT	TTTCCAGTAT	ATGTTACAGA	ATTGGATGGC	TGAATTTGAA	CAGATCCTTC	360
GGGAATTGAG	ACTTCAGGTC	AACTCCACGC	GCTTGGACCT	GTCCCTGACC	AAAGGATTAC	420
CCAATTGGAT	CTCCTCAGCA	TTTTCTTTCT	TFAAAAAATG	GGTGGGATTA	ATATTATTTC	480
GAGATACACT	TTGCTGTGGA	TTAGTGTTGC	TTCTTTTGATT	GGTCTGTAAG	CTTAAGGCC	540
AAACTAGGAG	AGACAAGGTG	GTATTGCCC	AGGCGCTTGC	AGGACTAGAA	CATGGAGCTT	600
CCCTGATAT	ATCTATGCTT	AGGCAATAGG	TCGCTGGCCA	CTCAGCTCTT	ATATCCCATG	660
AGGCTAGTCT	CATTGCACGG	GATAGAGTGA	GTGTGCTTCA	GCAGCCCGAG	AGAGTTGCAC	720
GGCTAAGCAC	TGCAATGGAA	AGGCTCTGCG	GCATATATGA	GCTTATTCTA	GGGAGACATG	780
TCATCTTTCA	AGAAGGTTGA	GTGTCCAAGT	GTCTTTCCTC	CAGGCAAAAC	GACACGGGAG	840
CAGGTCAGGG	TTGCTCTGGG	TAAAAGCCTG	TGAGCCTAAG	AGCTAATCCT	GTACATGGCT	900
CCTTTACCTA	CACACTGGGG	ATTTGACCTC	TATCTCCACT	CTCATTAAAT	TGGGTGGCCT	960
ATTTGCTCTT	ATTAAAAGGA	AAGGGGGAGA	TGTTGGGAGC	CGCGCCCA	TTCCCGTTTA	1020
CAAGATGGCG	CTGACAGCTG	TGTTCTAAGT	GGTAAACAAA	TAATCTGCGC	ATGCGCCGAG	1080
GGTGGTTCTT	CACTCCATGT	GCTCTGCCTT	CCCCGTGACG	TCAACTCGGC	CGATGGGCTG	1140
CAGTCAATCA	GGGAGTGACA	CGTCCTAGGC	GAAGGAAAAT	TCTCCTTAAT	AGGGACGGGG	1200
TTTCGTTTTT	TCTCTCTCTT	GCTTCGCTCT	CTCTTGCTTC	TTGCTCTCTT	TTCTGAAGA	1260
TGTAAGAATA	AAGCTTTGCC	GCAGAAGATT	CTGGTCTGTG	GTGTTCTTCC	TGGCCGCTCG	1320
TCAGAACGCG	TCTAATAACA	ATTGGTGCCG	AAACCCGGGT	GATAATGATT	ATCATCTACA	1380
TATCACAACG	TGCGTGGAGG					1400

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 1 3 6 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

CCTCCACGCA	CGTTGTGATA	TGTAGATGAT	AATCATTATC	ACTTTACGGG	TCCTTTCACT	60
ACAAC TGCCA	CGAGGCCCCG	TGCTCTGGTA	ATAGATCTTT	GCTGAAAAGG	CACACACATG	120
ACACATTACT	CAAGGTGGGC	TCATCTGAGC	TGCAGATTCA	GCTTAATATG	AATCTTGCCA	180
ATTGTGTGAA	ATCATAAATC	TTCAAAGTGA	CACTCATTGC	CAGACACAGG	TGCCCACCTT	240
TGGCATAATA	AACAAACACA	AATTATCTAT	TATATAAAGG	GTGTTAGAAG	ATGCTTTAGA	300
ATACAAATAA	ATCATGGTAG	ATAACAGTAA	GTTGAGAGCT	TAAATTTAAT	AAAGTGATAT	360
ACCTAATAAA	AATTAAATTA	AGAAGGTGTG	AATATACTAC	AGTAGGTAAA	TTATTTTCATT	420
AATTTATTTT	CTTTCTTAAT	CCTTTATAAT	GTTTTCTGCT	ATTGTCAATT	GCACATCCAT	480
ATGTTCAATT	CTTCACTGTA	ATGAAGAAAT	GTAGTAAATA	TACTTTCCGA	ACAAGTTGTA	540
TCAAATATGT	TACACTTGAT	TCCGTGTGTT	ACTTATCATT	TTATTATTAT	ATTGATTGCA	600
TTCTTTCGTT	ACTTGATATT	ATTACAAGGT	ACATATTTAT	TCTCTCAGAT	CTTCATTATA	660
CTCTAACCAT	TTTATAACAT	ACTTTATTTA	TTCAITTTCTT	ATGTGTGCTG	TGAGGCACAA	720
ATGCCAGAGA	GAAC TTGAGC	AGATAAGAGG	ACAAATTGCA	AGAGTCAGTT	ACCTCCTGCT	780
GTTCCTTGGA	AACTCAGGAT	CAAATT CAGG	TTGT CAGGCT	TGGCAGCATG	CACTTTTTCAC	840
CAGTGCCCTCC	ATCTTGCTAG	CCCTGAACAT	CAAGCTTTGC	AGACAGACAG	GCTACACTAA	900
GTGAACTGGT	CATT CACAGC	ATGCATGGTG	ATTTATTGTT	ACTTTCTATT	CCATGCCTTT	960
ACTATTTCTA	CTAGGTGCTA	GCTAGTACTG	TATTTTCGAGA	TAGAAGTTAC	TGAAAGAAAA	1020
TTACATTGTT	TTCTATAGAT	CCTTGATACT	CTTTCAGCAG	ATATAGAGTT	TTAATCAGGT	1080
CCTAGACCCT	TTCTTCACTC	TTATTAAATA	CTAAGTACAA	ATTAAAGTTA	TCCAAAACAG	1140
TACGGATGTT	GATTTTGTGC	AGTTCTACTA	TGATAATAGT	CTAGCTTCAT	AAATCTGACA	1200
CAC TTATTGG	GAATGTTTTT	GTTAATAAAA	GATTCAGGTG	TTACTCTAGG	TCAAGAGAAT	1260
ATTAAACATC	AGTCCCAAAT	TACAAACTTC	AATAAAAGAT	TTGACTCTCC	AGTGGTGGCA	1320
ATATAAAGTG	ATAATGATTA	TCATCTACAT	ATCACACAGT	GCGTGGAGG		1369

配列番号 : 1 6

配列の長さ : 2 2 1 1 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

GAATTCCTCT	ATCCCTAATC	CAGATTGGTG	GAATAACTTG	GTATAGATGT	TTGTGCATTA	60
AAAACCCCTGT	AGGATCTTCA	CTCTAGGTCA	CTGTTCAGCA	CTGGAACCTG	AATTGTGGCC	120
CTGAGTGATA	GGTCCCTGGGA	CATATGCAGT	TCTGCACAGA	CAGACAGACA	GACAGACAGA	180
CAGACAGACA	GACAGACGTT	ACAAACAAAC	ACGTTGAGCC	GTGTGCCAAC	ACACACACAA	240
ACACCACTCT	GGCCATAATT	ATTGAGGACC	TTGATTTATT	ATTCTGTGTT	TGTGAGTCTG	300
TCTGTCTGTC	TGTCTGTCTG	TCGTCTGTCT	TATCAAAACCA	AAAGAAACCA	AACAATTATG	360
CCTGCCTGCC	TGCCTGCCTG	CCTACACAGA	GAAATGATTT	CTTCAATCAA	TCTAAAACGA	420
CCTCCCTAAGT	TTGCCTTTT	TCTCTTTCTT	TATCTTTTTC	TTTTTTCTTT	TCCTCTCTCT	480
TCCTTCCTTC	CTTCCTTCCT	TCCTTCCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTACTTTCT	540
TTCTTTCTCT	CTTACATTTA	TTCTTTTCAT	ACATAGTTTC	TTAGTGTAA	CATCCCTGAC	600
TGCTCTGAAG	ACACTTTGTA	GGCCTCAATC	CTGTAAAGAGC	CTTCCTCTGC	TTTTCAAATG	660
CTGGCATGAA	TGTTGTACCT	CACATGACC	AGCTTAGTCT	TCAAGTCTGA	GTACTGGAA	720
AGGAGTTCCA	AGAAGACTGG	TTATATTTTT	CATTTATTAT	TGCATTTTAA	TTAAAAATTA	780
ATTTACACCA	AAGAATTTAG	ACTGACCAAT	TCAGAGTCTG	CCGTTTAAAA	GCATAAGGAA	840
AAAGTAGGAG	AAAAACGTGA	GCTGTCTGT	GGATGGTCTGA	GGCTGCTTTA	GGGAGCCTCG	900
TCACCATTTCT	GCACTTGCAA	ACCGGGCCAC	TAGAACCCCG	TGAAGGGAGA	AACCAAGCG	960
ACCTGGAAAC	ATGAGGTCAC	ATGAAGGCCA	GCCACCTCCA	TCTTGTGTGT	CGGGAGTTCA	1020
GTTAGCAGAC	AAGATGGCTG	CCATGCACAT	GTTGTCTTTT	AGCTTGGTGA	GGTCAAAGTA	1080
CAACCGAGTC	ACAGAACAAG	GAAGTATACA	CAGTGAGTTC	CAGGTCACCT	AGAGTTTACA	1140
CAGAGAAACC	ACATCTTGAA	AAAAACAAAA	AAATAAAATTA	AATAAAATATA	ATTTAAAAAT	1200
TTAAAAATAG	CCGGGAGTGA	TGGCGCATGT	CTTTAATCCC	AGCTCTCTTC	AGGCAGAGAT	1260
GGGAGGATTT	CTGAGTTTGA	GGCCAGCCTG	GTCTGCAAAG	TGAGTTCCAG	GACAGTCAGG	1320
GCTATACAGA	GAAACCCCTGT	CTTGAAAACT	AAACTAAAT	AAACTAACT	AAACTAAAAA	1380
AATATAAAAT	AAAAATTTTA	AAGAATTTTA	AAAAACTACA	GAAATCAAAC	ATAAGCCAC	1440
GAGATGGCAA	GTAACCTGCA	TCATAGCAGA	AATATTATAC	ACACACACAC	ACACAGACTC	1500
TGTCATAAAA	TCCAAATGTGC	CTTCATGATG	ATCAAAATTC	GATAGTCAGT	AATACTAGAA	1560
GAATCATATG	TCTGAAAAATA	AAAGCCAGAA	CCTTTTCTGC	TTTTGTTTTC	TTTTGCCCCA	1620
AGATAGGGTT	TCTCTCAGTG	TATCCCTGGC	ATCCCTGCC	GGAACCTCCT	TTGTAGGTTT	1680
GGTAGCCTCA	AACTCAGAGA	GGTCCCTCTCT	GCCTGCCTGC	CTGCCTGCCT	GCCTGCCTGC	1740
CTGCCTGCCT	GCCTGCCTCA	CTTCTTCTGC	CACCCACACA	ACCGAGTCGA	ACCTAGGATC	1800
TTTATTTCTT	TCTCTTTCTC	TCTTCTTTCT	TTCTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	1860
CTTTCTTTCT	TTCTTATTCA	ATTAGTTTTC	AATGTAAGTG	TGTGTTTGTG	CTCTATCTGC	1920
TGCCTATAGG	CCTGCTTGCC	AGGAGAGGGC	AACAGAACCT	AGGAGAAACC	ACCATGCAGC	1980
TCCTGAGAA	AAGTGAAAAA	ACAACAAAAA	AAGGAAATTC	TAATCACATA	GAATGTAGAT	2040
ATATGCCGAG	GCTGTCAGAG	TGCTTTTTTAA	GGCTTAGTGT	AAGTAATGAA	AATTGTTGTG	2100
TGCTTTTAT	CCAAACACAG	AAGAGAGGTG	GCTCGGCTCG	CATGCTGTT	GTCTGCATGT	2160
AGACCAGGCT	GGCCTTGAAC	ACATTAATCT	GTCTGCCTCT	GCTTCCCTAA	TGCTGCGATT	2220
AAAGGCATGT	GCCACCACTG	CCCGGACTGA	TTTCTTCTTT	TTTTTTT	TGGAAAAATAC	2280
CTTCTTTCT	TTTCTCTCT	CTCTTCTTCT	CTTCTTCTCT	TTCTTTCTAT	TCTTTTCTT	2340
TTTCTTTTCT	CTTTTTTTT	TTTTTTTTTAA	AATTTGCCTA	AGGTTAAAGG	TGTGCTCCAC	2400
AATTGCCTCA	GCTCTGCTCT	AATTCTCTTT	AAAAAAAAC	AAACAAAAA	AAAAACAAA	2460

CAGTATGTAT	GTATGTATAT	TTAGAAGAAA	TACTAATCCA	TTAATAACTC	TTTTTTCCTA	2520
AAATTTCATGT	CATTCTTGTT	CCACAAAGTG	AGTTCCAGGA	CTTACCAGAG	AAACCCCTGTG	2580
TTCAAATTTTC	TGTGTTCAAG	GTCAACCCTGG	CTTACAAAGT	GAGTTCCAAG	TCCGATAGGG	2640
CTACACAGAA	AAACCATATC	TCAGAAAAAA	AAAAAGTTCC	AAACACACAC	ACACACACAC	2700
ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAG	CGCGCCGCGG	CGATGAGGGG	2760
AAGTCGTGCC	TAAAAATAAA	ATTTTTCTGG	CCAAAGTGAA	AGCAAATCAC	TATGAAGAGG	2820
TACTCCTAGA	AAAAATAAA	ACAAACGGGC	TTTTTAATCA	TTCCAGCACT	GTTTTAATTT	2880
AACTCTGAAT	TTAGTCTTGG	AAAAGGGGGC	GGGTGTGGGT	GAGTGAGGGC	GAGCGAGCAG	2940
ACGGGCGGGC	GGGCGGGTGA	GTGGCCGGCG	CGGGTGGCAG	CGAGCACCAG	AAAACAACAA	3000
ACCCCAAGCG	GTAGAGTGTT	TTAAAAATGA	GACCTAAATG	TGGTGGAACG	GAGGTGCGCG	3060
CCACCCTCCT	CTTCCACTCC	TTAGATGCTC	CCTTCCCCCT	ACTGTGCTCC	CTTCCCCCTAA	3120
CTGTGCCTAA	CTGTGCCTGT	TCCCTCACCC	CGCTGATTCG	CCAGCGACGT	ACTTTGACTT	3180
CAAGAACGAT	TTTGCTTGTT	TTCAACGCTC	CCTGTCATAC	TTTCGTTTTT	GGGTGCCCCG	3240
GTCTAGCCCC	TTCCGCTATGT	TCCGGGCGGA	CGATGGGGAC	CGTTTTGTGCC	ACTCGGGAGA	3300
AGTGGTGGGT	GGGTACGCTG	CTCCGTCTGT	CGTGCCTGAG	TGCCGGAAAC	TGAGCTCGGG	3360
AGACCCCTCG	GAGAGACAGA	ATGAGTGAGT	GAATGTGGCG	GCGCGTGACC	GATCTGTATT	3420
GGTTTGTATG	GTTGATCGAG	ACCATTGTTC	GGCGACACCT	AGTGGTGACA	AGTTTCGGGA	3480
ACGCTCCAGG	CTCTCTCAGG	TGGTGACACA	GGAGAGGGAA	GTGCCTGTGG	TGAGGCGACC	3540
AGGGTGACAG	GAGGCGGGC	AAGCAGGCGG	GAGCGTCTCG	GAGATGGTGT	CGTCTTTAAG	3600
GACGGTCTCT	AACAAGGAGG	TCGTACAGGG	AGATGGCCAA	AGCAGACCGA	GTTGCTGTAC	3660
GCCCTTTTGG	GAAAAATGCT	AGGGTTGGTG	GCAACGTTAC	TAGGTCGACC	AGAAGGCTTA	3720
AGTCCCTACCC	CCCCCCCCCT	TTTTTTTTTT	TTTCTCCAG	AAGCCCTCTC	TTGTCCCCGT	3780
CACCGGGGGC	ACCGTACATC	TGAGGCCGAG	AGGACGCGAT	GGGCCCGGCT	TCCAAAGCCG	3840
TGTGGCTCGG	CCAGCTGGCG	CTTCGGGTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTCTCTCA	3900
GAAGCCCTGT	CTGTGCTGT	CACCGGGGGC	GCTGTACTTC	TGAGGCCGAG	AGGACGCGAT	3960
GGGCCCGGGC	TTCCAAGCCG	GTGTGGCTCG	GCCAGCTGGA	GCTTCGGGTC	TTTTTTTTTT	4020
TTTTTTTTTT	TTTTTTTCTC	CAGAAGCCTT	GTCTGTCTGT	GTCACCGGGG	GCGCTGTACT	4080
TCTGAGGCCG	AGAGGACGCG	ATGGGTCCGG	TTCCAAGCCG	ATGTGGCGGG	GCCAGCTGGA	4140
GCTTCGGGTT	TTTTTTTTTT	CTCCAGAAGC	CCTCTCTTGT	CCCGCTCACC	GGGGGCGGTG	4200
TACTTCTGAG	GCCGAGAGGA	CGTGATCGGC	CCGGGTTCCT	GGCGGATGTC	GCCCGGTCAG	4260
CTGGAGCTTT	GGATCTTTTT	TTTTTTTTTT	CCTCCAGAAG	CCCTCTCTTG	TCCCGGTCAC	4320
CGGGGGCACC	TTACATCTGA	GGGCGAGAGG	ACGTGATGGG	TCCGGCTTCC	AAGCCGATGT	4380
GGCGGGGCCA	GCTGGAGCTT	CGGGTTTTTT	TTTTTTTCTC	CAGAAGCCCT	CTCTTGTCCC	4440
CGTCACCGGG	GGCGCTGTAC	TTCTGAGGCC	GAGAGGACGT	GATGGGCCCC	GGTTCCAGGC	4500
GGATGTGCGC	CGGTCACTGT	GAGCTTTGGA	TCATTTTTTT	TTTTCCCTCC	AGAAGCCCTC	4560
TCTTGTCCCC	GTCAACGGGG	GCACCGGTACA	TCTGAGGCCG	AGAGGACACG	ATGGGCCTGT	4620
CTTCCAAGCC	GATGTGGCCC	GGCCAGCTGG	AGCTTCGGGT	CTTTTTTTTT	TTTTTTTCTC	4680
CAGAAGCCTT	GTCTGTGCGT	GTCACCCGGG	GCGCTGTACT	TCTGAGGCCG	AGAGGACGCG	4740
ATGGGCCCGG	CTTCCAAGCC	GGTGTGGCTC	GGCCAGCTGG	AGCTTCGGGT	CTTTTTTTTT	4800
TTTTTTTTTT	TTCCCTCCAGA	AACCTTGTCT	GTCTGTGTCA	CCCGGGGCGC	TTGTACTTCT	4860
GATGCCGAGA	GGACGCGATG	GGCCCGTCTT	CCAGGCCGAT	GTGGCCCGGT	CAGCTGGAGC	4920
TTTGGATCTT	TTTTTTTTTT	TTTTCTCTCA	GAAGCCCTCT	CTTGTCCCCG	TCACCGGGGG	4980
CACCTTACAT	CTGAGGCCTA	GAGGACACGA	TGGGCCCGGG	TTCCAGGCCG	ATGTGGCCCC	5040
GTCAGCTGGA	GCTTTGGATC	TTTTTTTTTT	TTTTCTTCCA	GAAGCCCTCT	TGTCCCGGTC	5100
ACCGGTGGCA	CTGTACATCT	GAGGCGGAGA	GGACATTATG	GGCCCGGCTT	CCAAATCCGAT	5160
GTGGCCCGGT	CAGCTGGAGC	TTTGGATCTT	ATTTTTTTTT	TAATTTTTTT	TTCCAGAAGC	5220
CCTCTTGTCC	CTGTCAACGG	TGGCACGGTA	CATCTGAGGC	CGAGAGGACA	TTATGGGCCC	5280
GGCTTCCAGG	CCGATGTGGC	CCGGTCAGCT	GGAGCTTTGG	ATCTTTTTTT	TTTTTTTTTCT	5340
TTTTTCTCTC	AGAAGCCCTC	TCTGTCCCTG	TCACCGGGGG	CCCTGTACGT	CTGAGGCCGA	5400
GGGAAAGCTA	TGGGCGCGGT	TTTCTTTCAT	TGACCTGTCC	GTCTTATCAG	TTCTCCGGGT	5460
TGTCAGGGTC	GACCAAGTTGT	TCCTTTGAGG	TCCGGTTCTT	TTCTGTTATGG	GGTCATTTTT	5520
GGGCCACCTC	CCCAGGTATG	ACTTCCAGGC	GTCTGTGCTC	GCCTGTCACT	TTCTTCCCTG	5580
TCTCTTTTAT	GCTTGTGATC	TTTTCTATCT	GTTCTTATTT	GACCTGGAGA	TAGGTACTGA	5640
CACGCTGTCC	TTTCCCTATT	AACACTAAAG	GATCACTATA	AGAGACCCCT	TCGATTTAAG	5700
GCTGTTTTTG	TTGTCCAGCC	TATTCTTTTT	ACTGGCTTGG	GTCTGTCCGG	GTGCCTGAAG	5760
CTGTCCCCGA	GCCACGCTTC	CTGCTTTCCC	GGGCTTGTCT	CTTGGCTGTG	CTTGTCTGTG	5820
GCAGCTTGTG	ACAACCTGGG	GCTGTGACTT	TGCTGCGTGT	CAGACGTTTT	TCCCGATTTC	5880
CCCGAGGTGT	CGTTGTCAAC	CCTGTCCCGG	TTGGAATGGT	GGAGCCAGCT	GTGGTTGAGG	5940
GCCACCTTAT	TTCCGGCTCAC	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTCT	TTGGAGTCCC	GAACCTCCGC	6000
TCTTTTCTCT	TCCCGGTCTT	TCTTCCACAT	GCCTCCCGAG	TGCATTTCTT	TTTGTTTTTT	6060
TTCTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTGGGGAGGT	GGAGAGTCCC	GAGTACTTCA	CTCTGTCTG	6120

TGGTGTCCAA	GTGTTTCATGC	CACGTGCCTC	CCGAGTGCAC	TTTTTTTTGT	GGCAGTGCCT	6180
CGTTGTGTTT	TCCTGTTCTG	TGTCTGCCCG	TATCAGTAAC	TGTCTTGCCC	CGCGTGTAA	6240
ACATTCCTAT	CTCGCTTGTT	TCTCCCGATT	GCGCGTCGTT	GCTCACTCTT	AGATCGATGT	6300
GGTGCTCCCG	AGTTCTCTTC	GGGCCAGGGC	CAAGCCGCGC	CAGGCGAGGG	ACGGACATTC	6360
ATGGCGAATG	GCGGCCGCTC	TTCTCGTTCT	GCCAGCGGGC	CCTCGTCTCT	CCACCCCATC	6420
CGTCTGCCGG	TGGTGTGTGG	AAGCCAGGGG	TGCGGCTCTC	CGGCCCCGAC	CTGCCCCGCG	6480
CGCACTTTTC	TCAGTGGTTC	GCGTGGTCC	TGTGGATGTG	TGAGGCGCCC	GGTTGTGCC	6540
TCACGTGTTT	CACTTTGGTC	GTGTCTCGCT	TGACCATGTT	CCCAGACTCG	GTGGATGTGG	6600
CCGGTGGCGT	TGCATACCCT	TCCCGTCTGG	TGTGTGCACG	CGCTGTTTCT	TGTAAGCGTC	6660
GAGGTGCTCC	TGGAGCGTTC	CAGGTTTGTC	TCCTAGGTGC	CTGCTTCTGA	GCTGGTGGTG	6720
GCGCTCCCCA	TTCCCTGGTG	TGCCTCCGGT	GCTCCGCTCG	GCTGTGTGCC	TTCCCGTTTG	6780
TGCTGTAGAA	GCCCGTGAGA	GGGGGGTCTG	GGAGAGAAGC	AGGGGCAAGA	CCCCCTTCT	6840
TGGTGGGTG	AGGCGCCAC	CCCGCGACTA	GTACGCTGTG	GCGTAGGGCT	GGTGTGAGC	6900
GGTCCGCGCT	GGGGTTGGAA	AGTTTCTCGA	GAGACTCATT	GCTTTCCTCG	GGGGAGCTTT	6960
GAGAGGCCTG	GCTTTCGGGG	GGGACCGGTT	GCAGGGTCTC	CCCTGTCCGC	GGATGCTCAG	7020
AATGCCCTTG	GAAGAGAACC	TTCTGTTGTC	CGCAGACCCC	CCCGCGCGGT	CGCCCGCGTG	7080
TTGGTCTTCT	GGTTTCCCTG	TGTGCTCGTC	GCATGCATCC	TCTCTCGGTG	GCCGGGGCTC	7140
GTCCGGGTTT	TGGGTCCGTC	CCGCCCTCAG	TGAGAAAGTT	TCCTTCTCTA	GCTATCTTCC	7200
GGAAAGGGTG	CGGGCTTCTT	ACGGTCTCGA	GGGGTCTCTC	CCGAATGGTC	CCCTGGAGGG	7260
CTCCGCCCTT	GACCGCCTCC	CGCGCGCGCA	GCGTTTGCTC	TCTCGTCTAC	CGCGGCCCGC	7320
GGCTTCCCGC	CTCCGAGTTC	GGGGAGGGAT	CACGCGGGGC	AGAGCCTGTC	TGTCTCTCTG	7380
CCGTGCTGTC	CGAGCATGTG	GCTCGGCTTG	TGTGGTTGGT	GGCTGGGGAG	AGGGCTCCGT	7440
GCACACCCCC	CGGTGCGCGT	ACTTTCCTCC	CCTCCTGAGG	GCCGCGGTGC	GGAGGGGGTG	7500
TGGGTAGGCG	ACGGTGGGCT	CCCGGGTCCC	CACCCGTCTT	CCCGTGCCCT	ACCGGTGCCT	7560
TCCGTCCCGT	GCGTCCCTCT	CGCTCGCGTC	CAGCACTTTG	GCCGCTCCCG	CGACGGCGGC	7620
CTGCGCCGCG	CGTGGTGCCT	GCTGTGTGCT	TCTCGGGCTG	TGTGGTTGTG	TCGCTCTGCC	7680
CCCCCTTCC	CGCGGACGCG	TTCCACGGC	TGGCGAAATC	GCGGGAGTCC	TCCTTCCCC	7740
CCTCGGCTCT	GAGAGGGTCC	GTGTCTGGCG	TTGATTGATC	TCGCTCTCGG	GGACGGGACC	7800
GTCTGTGGGG	AGAACGGCTG	TTGGCCCGCT	CCGGCGCGAC	GTCCGACGTG	GGGACCCACT	7860
GCCGCTCGGG	GGTCTTCGTC	GGTAGGCATC	GGTGTCTCGG	CATCGGTCTC	TCTCTCGTGT	7920
CGGTGTGCGC	TCCTCGGGCT	CCCGGGGGGC	CGTCTGTTTT	CGGGTCCGGT	CGGGCTCGCA	7980
GGTGTGGTGG	GACTGCTCAG	GGGAGTGGTG	CAGTGTGATT	CCCGCCGGTT	TTGCTCTCGG	8040
TGCCCTGACC	GGTCCGACGC	CCGAGCGGTC	TCTCGGTCCC	TTGTGAGGAC	CCCCCTCCGG	8100
GAGGGGCCCG	TTTCGGCCGC	CCTTGCCGTC	GTCCGCCGGC	CTCGTCTGTC	TGTGTCTGTT	8160
CCCCCTCCCC	GCTCGCCGCA	GCCGGTCTTT	TTTCTCTCT	CCCCCTCTCT	CCTCTGACTG	8220
ACCCGTGGCC	GTGCTGTGCG	ACCCCCGCGA	TGGGGCGGGC	CGGGCACGTA	CGCGTCCGGG	8280
CGGTACACCG	GGTCTTGCGG	GGGGGCCGAG	GGGTAAGAAA	GTCCGCTCGG	CGGGCGGGAG	8340
GAGCTGTGGT	TTGGAGGGCG	TCCCGGCCCC	GCGGCCGTGG	CGGTGTCTTG	CGCGGTCTTG	8400
GAGAGGGCTG	CGTGCGAGCG	GAAAAGGTTG	CCCCGCGAGG	GCAAAGGGAA	AGAGGCTAGC	8460
AGTGGTCATT	GTCCCGACCG	TGTGGTGGTC	TGTTGGCCGA	GGTGCCTCTG	GGGGGCTCGT	8520
CCGGCCCTGT	CGTCCGTCCG	GAAGGCGCGT	GTTGGGGCCT	GCCGGAGTGC	CGAGGTGGGT	8580
ACCTTGCGCG	TGGGATTAA	CCCGCGCGCG	TGTCCTCGGT	TGGCGGTGGG	GGCTCCGGTC	8640
GATGTCTACC	TCCCTCTCCC	CGAGGTCTCA	GGCCTTCTCC	GCGCGGGCTC	TCGGCCCTCC	8700
CCTCGTCTCT	CCCTCTCGCG	GGGTTCAAGT	CGCTCGTCTG	CCTCCCTCTC	TCGGTCTTTC	8760
CATCTCTCGC	GCAATGGGCG	CGCCCGAGTT	CACGGTGGGT	TCGTCTCTCC	CCTCCGCTTC	8820
TCGCGCGGGG	CTGGCCGCTG	TCCGGTCTCT	CCTGCTCCGAC	CCCGGTGGGC	GTGGTCTTCT	8880
CTCGCCGGCT	TCGCGGACTC	CTGGCTTCGC	CCGGAGGGTC	AGGGGGCTTC	CCGGTTCCCC	8940
GACGTTGCGC	CTCGCTGCTG	TGTGCTTGGG	GGGGGCCCGC	TGCGGCTTCC	GCCCGCCCGT	9000
GAGCCCTGCG	CGCACCCGCC	GGTGTGCGGT	TTCCGCCCGC	GGTCAGTTGG	GCCCTGGCGT	9060
TGTGTGCGGT	CGGGAGCGTG	TCCGCTTCGC	GGCGGCTAGA	CGCGGGTGTG	GCCGGGCTCC	9120
GACGGGTGGC	CTATCCAGGG	CTCGCCCCCG	CCGACCCCGC	CCTGCCCCTG	CCGGTGGTGG	9180
TCGTTGCTGT	GGGGAAGTGA	TGGTGTCTAC	GGTCAATCCC	TCCCGCGTGG	TTTGAAGTGC	9240
TCGCGCGGTG	CGCGCTTCTC	TTTCCGCCAA	CCCCACGCGC	AACCCACCA	CCTGCTCTCC	9300
CGGCCCCGGT	CGGTCCACCT	TCCGCTCTCT	CCGATGCCGA	GGGGTTCCGG	ATTGTGCCC	9360
GGGACGGAGG	GGAGAGCGGG	TAAGAGAGGT	GTCGGAGAGC	TGTCCCGGGG	CGACGCTCGG	9420
GTTGGCTTTG	CCCGGTGCGT	GTGCTCGCGG	ACGGGTTTTG	TCGGACCCCG	ACGGGGTCGG	9480
TCCGGCCGCA	TGCACTCTCC	CGTTCCGCGC	GAGCGCCCGC	CCGGCTCACC	CCCGGTTTGT	9540
CCTCCCGCGA	GGCTCTCCGC	CGCCGCGCGC	TCCTCTCTCT	CTCTCGCGCT	CTCTGTCCCG	9600
CCTGGTCTCT	TCCACCCCGC	GACGCTCCGC	TCGCGCTTCC	TTACCTGGTT	GATCCTGCCA	9660
GGTAGCATAT	GCTTGTCTCA	AAGATTAAAG	CATGCATGTC	TAAGTACGCA	CGGCCGGTAC	9720
AGTGAAACTG	CGAATGGCTC	ATTAAATCAG	TTATGGTTCC	TTTGGTTCGT	CGTCTCTCTC	9780

CTACTTGGAT	AACCTGTGGTA	ATTCTAGAGC	TAATACATGC	CGACGGGCGC	TGACCCCCCT	9940
TCCCGGGGGG	GGATCGGTGC	ATTTATCAGA	TCAAAACCAA	CCCGGTGAGC	TCCCTCCCGG	9900
CTCCGGCCGG	GGGTCCGGCG	CCGGCGGCTT	GGTGACTCTA	GATAACCTCG	GGCCGATCGC	9960
ACGCCCCCGG	TGGCGGCGAC	GACCCATTCC	AACGTCTGCC	CTATCAACTT	TCCGATGGTAG	10020
TCGCCGTGCC	TACCATGGTG	ACCACGGGTG	ACGGGGAATC	AGGGTTTCGAT	TCCGGAGAGG	10080
GAGCCTGAGA	AACGGCTACC	ACATCCAAGG	AAGGCAGCAG	GCGCGCAAT	TACCCACTCC	10140
CGACCCGGGG	AGGTAGTGAC	GAAAAATAAC	AATACAGGAC	TCTTTTCGAGG	CCCTGTAATT	10200
GGAATGAGTC	CACTTTAAAT	CCTTTAACGA	GGATCCATTG	GAGGGCAAGT	CTGGTGCCAG	10260
CAGCCGCGGT	AATTCAGCT	CCAATAGCGT	ATATTAAAGT	TGCTGCAGTT	AAAAAGCTCG	10320
TAGTTGGATC	TTGGGAGCGG	GCGGCGGTC	CGCCCGAGG	CGAGTCACCG	CCCGTCCCCG	10380
CCCCTTGCCF	CTCGGCGCCC	CCTCGATGCT	CTTAGCTBAG	TGTCCCGCGG	GGCCCGAAGC	10440
GTTTACTTTG	AAAAAATTAG	AGTGTTCAAA	GCAGGCCCGA	GCCGCCTGGA	TACCGCAGCT	10500
AGGAATAATG	GAATAGGACC	GCGGTTCCTAT	TTGTGTGGTT	TTCGGAACCTG	AGGCCATGAT	10560
TAAGAGGGAC	GGCCGGGGGC	ATTCTGATTG	CGCCGCTAGA	GGTGAAATTC	TTGGACCGGC	10620
GCAAGACGGA	CCAGAGCGAA	AGCATTTGCC	AAGAATGTTC	TCATTAAATCA	AGAACGAAAG	10680
TCGGAGGTTC	GAAGACGATC	AGATACCGTC	GATGTTCCGA	CCATAAACGA	TGCCGACTGG	10740
CGATGCGGCG	GCGTTATTCC	CATGACCCGC	CGGGCAGCTT	CCGGGAAACC	AAAGTCTTTG	10800
GGTTCCGGGG	GGAGTATGGT	TGCAAAGCTG	AAACTTAAAG	GAATTGACGG	AAGGGACCA	10860
CCAGGAGTGG	GCCTCGGGCT	TAATTTGACT	CAACACGGGA	AACCTCACCC	GGCCCGGACA	10920
CGGACAGGAT	TGACAGATTG	ATAGCTCTTT	CTCGATTCCG	TGGGTGGTGG	TGCATGGCCG	10980
TTCTTAGTTG	GTGGAGCGAT	TTGTCTGGTT	AAATCCGATA	ACGAACGAGA	CTCTGCCATG	11040
TCTCTAGTTT	ACCGGACCCC	CGAGCGGTCC	GCGTCCCCCA	ACTTCTTAGA	GGGCAAGTG	11100
GCGTTCAGCC	ACCCGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA	TGCCCTTAGA	TGTCGGGGC	11160
TGCACCGCGC	CTACACTGAC	TGGCTCAGCG	TGTGCCTACC	CTGCGCCGG	AGGCGCGGGT	11220
AACCCGTTGA	ACCCATTCCG	TGATGGGGAT	CGGGGATTGC	AATTATTCCC	CATGACGAG	11280
GAATTCCCA	TAAGTGC	TCATAAGCTT	GCGTTGATTA	AGTCCCTGCC	CTTTGTACAC	11340
ACCGCCCGTC	GCTACTACCG	ATTGGATGGT	TTAGTGAGGC	CCTCGGATCG	GGCCCGCCCG	11400
GGTCGGCCCA	CGGCCCTGGC	GGAGCGCTGA	GAAGACGGTC	GAACCTGACT	ATCTAGAGGA	11460
AGTAAAAGTC	GTAACAAGGT	TCCCGTAGGT	GAACCTGCGG	AAGGATCATT	AAACGGGASA	11520
CTGTGGAGGA	GCGCGGCGT	GCCCGCTCT	CCCCGTCTTG	TGTGTGCTCT	CGCCGGGAGG	11580
CGCGTGCGTC	CCGGGTCCCG	TGCGCCGCGT	TGCGAGCGAG	GTGTCTGAG	TGAGGTGAGA	11640
GAAGGGGTGG	GTGGGGTCCG	TCTGGGTCCG	TCTGGGACCG	CCTCCGATTT	CCCCTCCCCC	11700
TCCCTCTCC	CTCGTCCGGC	TCTGACCTCG	CCACCTTACC	GCGGCGGCGG	CTGCTCGCGG	11760
GCGTCTTGCC	TCTTTCCCGT	CCGGCTCTTC	CGTGTCTACG	AGGGGCGGTA	CGTCTTACG	11820
GGTTTTTGAC	CCGTCCCGGG	GGCGTTCCGT	CGTCCGGGCG	CGTCTTTCG	TCTCCCGGCA	11880
CCCATCCCCG	CCGCGGCTCT	GGCTTTTCTA	CGTTGGCTGG	GGCGGTGTGC	GGCTGTGGGG	11940
GGATGTGAGT	GTCGCGTGTG	GGCTCGCCCG	TCCCGATGCC	ACGCTTTTCT	GGCCCTCGCGT	12000
GTCCCTCCCGG	CTCCTGTCCC	GGGTACCTAG	CTGTCCGCTT	CCGGCGCGGA	GGTTTAAGGA	12060
CCCCGGGGGG	GTGCCCCCTG	CGCCCCCAGG	GTCGGGGGGC	GGTGGGGCCC	GTAGGSAAGT	12120
CGGTGCTTCG	GGCGGCTCTC	CCTCAGACTC	CATGACCCCTC	CTCCCCCCCG	TGCCCGCGTT	12180
CCCCGAGCGG	CGGTGCTGTG	GGGGGGTGG	TGTCTGGAGC	CCCCTCGGGC	GGCGTGGGGG	12240
CCCCGACCGC	GCCGCGGCT	TGCCCCGATT	CCGCGGGTCC	GTCCTGTCCG	TGCCGGTCCG	12300
GGGTTCGCGT	GTCGTTCCCG	TGTTTTTCCG	CTCCCGACCC	TTTTTTTCTT	CTCCCCCCCC	12360
CACGTGTCTC	GTTTCGTTCC	TGCTGGCCCG	CCTGAGGCTA	CCCCTCGGTC	CATCTGTTCT	12420
CTCTCTCTC	CGGGGAGAGG	AGGGCGGTGG	TGTTGGGGG	ACTGTGCCGT	CGTCAGCAC	12480
CGTGAGTTCC	CTCACACCCG	AAATACCGAT	ACGACTCTTA	GCGGTGGATC	ACTCGGCTCG	12540
TGCGTCGATG	AAGAACGCAG	CTAGCTGCGA	GAATTAAATGT	GAATTGCAGG	ACACATTGAT	12600
CATCGACACT	TGGAACGCAC	TTGCGGCCCC	GGGTTTCTCC	CGGGGCTACG	CCTGTCTGAG	12660
CGTCGGTTGA	CGATCAATCG	CGTCAACCCG	TGCGGTGGGT	GCTGCGCGGC	TGGGAGTTTG	12720
CTGCGAGGGC	CAACCCCCCA	ACCCGGGTCC	GGCCCTCCCT	CTCCCGAAGT	TCAGACGTGT	12780
GGGCGGTTGT	CGGTGTGGCG	CGCGCGCCCG	CGTCGCGGAG	CCTGGTCTCC	CCCGCGCATC	12840
CGCGCTCGCG	GCTTCTTCCC	GCTCCGCGCT	TCCCGCCCTC	GCCCGTGAC	CCCGGTCTCT	12900
GCCTCGCGTC	GGCGCCTCCC	GGACCGCTGC	CTCACCAGTC	TTTCTCGGTC	CCGTGCCCCG	12960
TGGGAACCCA	CCGCGCCCCC	GTGGCGCCCG	GGGGTGGGCG	CGTCCGCATC	TGCTCTGGTC	13020
GAGGTTGGCG	GTTGAGGGTG	TGCGTGCGCC	GAGGTGGTGG	TCGGTCCCT	GCGGCGCGG	13080
GGTTGTCCGG	GTGGCGGTCC	ACGAGGGCCG	TGCGTCCGCC	TGCGGTGGTT	GTCTGTGTGT	13140
GTTTGGGTCT	TGCGCTGGGG	GAGGCGGGGT	CGACCGCTCG	CGGGGTGGC	GCGGTGCGCC	13200
GGCGCCGCGC	ACCCCTCCGGC	TTGTGTGGAG	GGAGAGCGAG	GGCGAGAACG	GAGAGAGGTG	13260
GTATCCCCCG	TGGCGTTGCC	AGGGAGGGTT	TGGCTCCCG	CGTCCGTCCG	TCCCTCCCTC	13320
CCTCGGTGGG	CGCCTTCGCG	CCGACCGCGG	CCGCTAGGGG	CGGTGCGGGC	CCGTGGCCCC	13380
CGTGGCTCTT	CTTCGTCTCC	GCTTCTCCTT	CACCCGGGCG	GTACCCGCTC	CGGCGCCGGC	13440

CCGCGGGGACG	CCGCGGGCGTC	CGTGCGCCGA	TGCGAGTCA	CCCCGGGTGT	TGCGAGTTCC	13500
GGGAGGGAGA	GGGCCTCGCT	GACCCGTTGC	GTCCCGGCTT	CCCTGGGGGG	GACCCGGCGT	13560
CTGTGGGCTG	TGCGTCCCGG	GGGTTGCGTG	TGAGTAAGAT	CCTCCACCCC	CGCCGCCCTC	13620
CCCTCCCGCC	GGCCTCTCGG	GGACCCCTTG	AGACGGTTGG	CCGGCTCGTC	CTCCCGTGCC	13680
GCCGGGTGCC	GTCTCTTTCC	CGCCCGCCTC	CTCGCTCTCT	TCTTCCCGCG	GCTGGGCGCG	13740
TGTCCCCCTT	TTCTGACCGC	GACCTCAGAT	CAGACGTGGC	GACCCGCTGA	ATTTAAGCAT	13800
ATTAGTCAGC	GGAGGAAAAG	AAACTAACCA	GGATTCCCTC	AGTAACGGCG	AGTGAACAGG	13860
GAAGAGCCCA	GCGCCGAATC	CCCGCCGCGC	GTCGCGGCGT	GGGAAATGTG	GCGTACGGAA	13920
GACCCACTCC	CCGGCGCCGC	TCTGTGGGGG	CCCAAGTCCT	TCTGATCGAG	GCCCAGCCCG	13980
TGGACGGTGT	GAGGCCGGTA	GCGGCCCGGG	CCGCGCCGGG	TCCGGTCTTC	CCGGAGTCGG	14040
GTTGCTTGGG	AATGCAGCCC	AAAGCGGGTG	GTAACCTCCA	TCTAAGGCTA	AATACCGGCA	14100
CGAGACCGAT	AGTCAACAAG	TACCGTAAGG	GAAAGTTGAA	AAGAAC'TTG	AAGAGAGAGT	14160
TCAAGAGGGC	GTGAAACCGT	TAAGAGGTAA	ACGGGTGGGG	TCCGCGCAGT	CCGCCCGGAG	14220
GATTCAACCC	GGCGGCGCGC	GTCGCGCCGT	GCCCGGTGGT	CCCGGGCGGAT	CTTTCCCGCT	14280
CCCCGTTCTT	CCCGACCCCT	CCACCCGCGC	GTCGTTCCCT	TCTTCCCTCC	CGCGTCCGGC	14340
GCCTCCGGCG	GCGGCGCGCG	GGGGTGGTGT	GTCGTTGGCG	CGCGGCGGGG	GCCGGGGGTG	14400
GGGTCCGGCG	GGGACCGCCC	CCGGCCGGCG	ACCGGCCCGC	GCCGGGCGCA	CTTCCACCGT	14460
GGCGGTGGCG	GCGGACCGGC	TCCGGGACGG	CCGGGAAGGC	CCGGTTCGGG	AGGTGGCTCG	14520
GGGGGGGGCG	GCGCTCTCAG	GCGCGCGCGA	ACCACCTCAC	CCCGAGTGT	ACAGCCCTCC	14580
GGCCGCGCTT	TGCGCGAATC	CCGGGGCCGA	GGAAGCCAGA	TACCCGTCGC	CGCGCTCTCC	14640
CTCTCCCCCT	GTCCGCCTCC	CGGGCGGGCG	TGGGGGTGGG	GGCCGGGCGG	CCCCCTCCAC	14700
GGCGCGACCG	CTCTCCCAAC	CCCTCCCGTC	GCCTCTCTCG	GGGCCCGGTG	GGGGCGGGG	14760
CGGACTGTCC	CCAGTGCGCC	CCGGGCGTCC	TGCGCGCCGT	GGGTCCCGGG	GGGACCGTCC	14820
GTACGCGCTC	TCCCGACGAA	GCCGAGCGCA	CGGGGTTCGG	GGCGATGTTC	GCTACCCACC	14880
CGACCCGTCT	TGAAACACGG	ACCAAGGAGT	CTAACGCGTG	CGCGAGTCAG	GGGCTCGTCC	14940
GAAAGCCGCC	GTGGCGCAAT	GAAAGTGAAG	GGCCCCGCCC	GGGGGCCCGA	GGTGGGATCC	15000
CGAGGCCCTT	CCAGTCCGCC	GAGGGCGCAC	CACCGGCCCG	TCTCGCCCGC	CGCGCCGGGG	15060
AGGTGGAGCA	CGAGCGTACG	CGTTAGGACC	CGAAAGATGG	TGAACATATG	TTGGGCGAGG	15120
CGAAGCCAGA	GGAAACTCTC	GTGGAGGTCC	GTAGCGGTCC	TGACGTGCAA	ATCGGTCTCT	15180
CGACCTGGGT	ATAGGGGCGA	AAGACTAATC	GAACCATCTA	GTAGCTGGTT	CCCTCCGAAG	15240
TTTCCCTCAG	GATAGCTGGC	GCTCTCGCTC	CCGACGTACG	CAGTTTATAT	CGGTAAAGCG	15300
AATGATTAGA	GGTCTTGGGG	CCGAAACGAT	CTCAACCTAT	TCTCAAACCT	TAAATGGGTA	15360
AGAAGCCCGG	CTCGCTGGCG	TGGAGCCGGG	CGTGAATGCG	GAGTGCCCTAG	TGGGCCACTT	15420
TTGGTAAGCA	GAACCTGGCG	TGCGGGATGA	ACCGAACGCC	GGGTTAAGGC	GCCCGATGCC	15480
GACGCTCATC	AGACCCACGA	AAAGGTGTTG	GTGTGATATG	ACAGCAGGAC	GGTGGCCATG	15540
GAAGTCGGAA	TCCGCTAAGG	AGTGTGTAA	AACTCACCTG	CCGAATCAAC	TAGCCCTGAA	15600
AATGGATGGC	GCTGGAGCGT	CGGGCCCATC	CCCGGCCGTC	GCCGCGAGTC	GAACGGAAAC	15660
GGACGGGAGC	GGCCGCGGGT	GCGCGTCTCT	CGGGGTTCGG	GGTGCGTGCG	GGGGGCCCGT	15720
CCCCCGCCTC	CCCTCCGCGC	GCCGGGTTCC	CCCCCGCGCG	GTCCGGCCCC	GCGGAGCCCTA	15780
CGCCGCGACG	AGTAGGAGGG	CCGCTGCGGT	GAGCCTTGAA	GCCTAGGGCG	CGGGCCCGGG	15840
TGGAGCCGCC	GCAGGTGCAG	ATCTTGGTGG	TAGTAGCAAA	TATTCAAACG	AGAACTTTGA	15900
AGGCCGAAGT	GGAGAAGGGT	TCCATGTGAA	CAGCAGTTGA	ACATGGGTCA	GTCCGTCTCT	15960
AGAGATGGGC	GAGTGCCGTT	CCGAAGGGAC	GGGCGATGGC	CTCCGTTGCC	CTCGGCCGAT	16020
CGAAAGGGAG	TCCGGTTTCAG	ATCCCCGAAT	CCGGAGTGGC	GGAGATGGGC	GCCGCGAGGC	16080
CAGTGCGGTA	ACGCGACCGA	TCCCGGAGAA	GCCGCGGGGA	GGCCTCGGGG	AGAGTTCTCT	16140
TTTCTTTGTG	AAGGGCAGGG	CGCCCTGGAA	TGGGTTCCGC	CCGAGAGAGG	GGCCCGTGCC	16200
TTGGAAAGCG	TGCGGTTTCC	GGCGGCGTCC	GGTGAGCTCT	CGCTGGCCCT	TGAAAAATCCG	16260
GGGGAGAGGG	TGTAAATCTC	GCGCCGGGCC	GTACCCATAT	CCGACGAGG	TCTCCAAGGT	16320
GAACAGCCTC	TGGCATGTTG	GAACAATGTA	GGTAAGGGAA	GTCGGCAAGC	CGCATCCCTA	16380
ACTTCGGGAT	AAGGATTGGC	TCTAAGGGCT	GGGTCCGGTC	GGCTGGGGCG	CGAAGCGGGG	16440
CTGGGCGCGC	GCCGCGGCTG	GACGAGGCGC	CGCCGCCCTC	TCCACGTCCT	GGGGAGACCC	16500
CCCGTCTCTT	CCGCCCCGGC	CCGCCCTCCC	CTCTTCCCGG	CGGGGCCCGG	TGCTCCCCCG	16560
CGTCGTCTGC	ACCTCTCTTC	CCCCCTCCTT	CTTCCCGTCG	GGGGGCGGGT	CGGGGTCGG	16620
CGCGCGGCGC	GGGCTCCGGG	GCGGCGGGTC	CAACCCCGCG	GGGTTCCCGG	AGCGGGAGGA	16680
ACCAGCGGTC	CCCGGTGGGG	CGGGGGGGCC	GGACACTCGG	GGGGCCGGCG	GCGGCGGGCA	16740
CTCTGGACGC	GAGCCGGGCC	CTTCCCGTGG	ATCGCCTCAG	CTGCGGCGGG	CGTCCGCGCC	16800
GCTCCCGGGG	AGCCCGGGCG	GTGCCGGCGC	GGGTCCCTTC	CCCGCGGGGC	CTCGCTCCAC	16860
CCCCCATCG	CCTCTCCCGA	GGTGCGTGCG	GGGGCGGGG	GGGCGTGTCC	CGCGCGTGTG	16920
GGGGGAACCT	CCGCGTCCGT	GTTCCCCCCG	CGGTTCGCTC	CCCCGGGCGG	CGGTTTTCCG	16980
CGCGGCGCCC	CCGCCTCGGC	CGGCGCCTAG	CAGCCGACTT	AGAACTGGTG	CGGACAGGG	17040
GAATCCGACT	GTTTAATTAA	AACAAAGCAT	CGCGAAGGCC	CGCGGCGGGT	GTTGACGCGA	17100

TGTGATTCT	GCCAGTGTCT	CTGAATGTCA	AAGTGAAGAA	ATTCAATGAA	GCGCGGGTAA	17160
ACGGCGGGAG	TAACATATGAC	TCTCTTAAGG	TAGCCAAATG	CCTCGTCATC	TAATTAGTGA	17220
CGGCATGAA	TGGATGAACG	AGATTCCAC	TGTCCTTACC	TACTATCCAG	CGAAACCACA	17280
GCCAAGGGAA	CGGGCTTGGC	GGAATCAGCG	GGGAAAGAAG	ACCTGTGTA	GCTTGACTCT	17340
AGTCTGGCAC	GGTGAAGAGA	CATGAGAGGT	GTAATAAAG	TGGGAGGCC	CCGGCGCCCG	17400
GCCCCGTCT	CGCGTCGGGG	TCGGGGCAGC	CCGGCTCGC	GGGCGCCCG	TGAAATACCA	17460
CTACTCTCAT	CGTTTTTCA	CTGACCCGGT	GAGGCGGGG	GGCGAGCCCC	GAGGGGTCT	17520
CGTCTCTGGC	GCCAAGCGTC	CGTCCCGCGC	GTGCGGGCGG	GCGCGACCCG	CTCCGGGGAC	17580
AGTGCCAGGT	GGGGAGTTTG	ACTGGGGCGG	TACACCTGTC	AAACGGTAAC	GCAGGTGTCC	17640
TAAGGCGAGC	TCAGGGAGGA	CAGAAACCTC	CCGTGGAGCA	GAAGGGCAAA	AGCTCGCTTG	17700
ATCTTGATTT	TCAGTACGAA	TACAGACCGT	GAAAGCGGG	CTTACGATC	CTTCTGACCT	17760
TTTGGGTTTT	AAGCAGGAGG	TGTCAGAAAA	GTTACCACAG	GGATAACTGG	CTTGTGGCGG	17820
CCAAGCGTTC	ATAGCGACGT	CGCTTTTGA	TCCTTCGATG	TCGGCTCTTC	CTATCATTTG	17880
GAAGCAGAAT	TCACCAAGCG	TTGGATTGTT	CACCCACTAA	TAGGGAACGT	GAGCTGGGTT	17940
TAGACCGTCG	TGAGACAGGT	TAGTTTTACC	CTACTGATGA	TGTGTTGTTG	CCATGGTAAT	18000
CCTGCTCAGT	ACGAGAGGAA	CCGACGGTTC	TGTATGTGCT	TGGCTGGAGG	18060	
GCCAATGGGG	GGAAGCTACC	ATCTGTGGGA	TTATGACTGA	ACGCTCTAA	GTGAGAATCC	18120
GCCCAAGCGG	AACGATACGG	CAGCGCCGAA	GGAGCCTCGG	TTGGCCCCGG	ATAGCCGGGT	18180
CCCGCTCCGT	CCCGCTCCGG	GGGGTCCCG	CGGCGCCCG	CGGCGCGCG	GGGTCTCCCC	18240
CCGCGGGCGG	TCGGGACCGG	GGTCCGGTGC	GGAGAGCCGT	TCGTCTTGGG	AAACGGGGTG	18300
CGGCGGAA	GGGGCCGGC	CTCTCGCCCG	TCACGTTGAA	CGCACGTTCC	TGTGGAACCT	18360
GGCGCTAAAC	CATTCTGAGA	CGACCTGCTT	GTTTCGTACG	TAGCAGAGCA	18420	
GCTCCCTCGC	TGCGATCTAT	TGAAAGTCAG	CCCTCGACAC	AAGGGTTTGT	CTCTGCGGGC	18480
TTTCCCGTGC	CACGCCCCGT	CGCTCGCAGC	CGACCGTGT	GCCGCCCGGG	CGTACCCGGG	18540
GCGGTGCGCT	CGGCCCCCGC	GCGGTTGGCC	GAACGACCGT	GTGGTGGTTG	GGGGGGGGAT	18600
CGTCTTCTCC	TCCGTCTCCC	GAGGACGGTT	CGTTTCTCTT	TCCCTTCCG	TCGCTCTCCT	18660
TGGGTGTGGG	AGCCTCGTGC	CGTCCGACCC	GCGGCTGACC	GTGCGCTGCC	GCCCGAGCCC	18720
CTTCCCCCTC	GGCCTTGGCC	AAGCCGGAGG	GCGGAGGAGG	GGGATCGGCG	GCGCGCGCGA	18780
CCGCGGCGCG	GTGACGCACG	GTGGGATCCC	CATCTTCGGC	GUGTCCGTCC	GGGACGGGCG	18840
GTTGGAGGGG	CGGGAGGGGT	TTTCCCGTG	AACGCCGCGT	TCGGCGCCAG	GCTCTTGCGG	18900
GCCGGGGGGG	CGCTCTCTCC	GCCCGAGCAT	CCCCACTCCC	GCCCCCTCCT	TTCCGCGCGC	18960
GCGCGGCGGA	CGTGCGTACG	AGGGGAGGAT	GTCCGCGGTG	GGAGGCGGAG	AGGGTCCGGC	19020
GCGCGCGCTC	TTCCATTTTT	TCCCCCCAA	CTTCGGAGGT	CGACCACTAC	TCCGGGCGAC	19080
ACTTTGTTTT	TTTTTTTTTCC	CCCGATGCTG	GAGGTCGACC	AGATGTCCGA	AAGTGTCCCC	19140
CCCCCCCCCC	CCCCCGGGG	GCGAGCGGG	GGGCCACTCT	GGACTCTTTT	TTTTTTTTTTT	19200
TTTTTTTTTT	TAAATTCCT	GGAACCTTA	GGTCGACCAG	TTGTCCGTCT	TTTACTCCTT	19260
CATATAGGTC	GACCAGTACT	CCGGGTGGTA	CTTTGTCTTT	TTCTGAAAAT	CCCAGAGGTC	19320
GACCAGATAT	CCGAAAGTCC	TCTCTTTCCC	TTTACTCTTC	CCCACAGCGA	TTCTCTTTTT	19380
TTTTTTTTTT	TTTGTGTGC	CTCTTTTGA	CTTATATACA	TGTAAATAGT	GTGTACGTTT	19440
ATATACTTAT	AGGAGGAGGT	CGACCACTAC	TCCGGGCGAC	ACTTTGTGTT	TTTTTTTTTTT	19500
TCCACCGATG	ATCGAGGTGC	ACCAGATGTC	CGAAAGTGTC	CCGTCCCCCC	CTCCCCCCCC	19560
CCGCGACGCG	GCGGGCTCAC	TCTGGACTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTAAATTTT	19620
TGGAACCTTA	AGGTGCGACCA	GTTGTCCGTC	TTTCACTCAT	TCATATAGGT	CGACCGGTGG	19680
TACTTGTCT	TTTTCTGAAA	ATCGCAGAGG	TCGACCAGAT	GTGAGAAAGT	CTGGTGGTGC	19740
ATAAATTATC	TGATCTAGAT	TGTGTTTCT	GTTTTTCAGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	19800
TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	19860
TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	19920
TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	19980
TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	20040
TACACAAACA	TGCACTTTTT	TAAATAAATA	TTTTTAAAT	AAATGCGAAA	ATCGACCAAT	20100
TATCCCTTTC	CTTCTCTCTC	TTTTTTAAAA	ATTTTCTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	20160
TGTGTGTGTG	TGCGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGCAGCGT	GCGCGCGCTC	GTTTTATAAA	20220
TACTTATAAT	AATAGGTCGC	CGGGTGGTGG	TAGCTTCCCG	GACTCCAGAG	GCAGAGGCAG	20280
GCAGACTTCT	CAGTTCGAGG	CCAGCCTGGT	CTACAGAGGA	ACCCTGTCTC	GAAAAATGAA	20340
AATAAATACA	TACATACATA	CATACATACA	TACATACATA	CATACATACA	TACATATGAG	20400
GTTGACCACT	TGTCAATCCT	TTAGAATTTT	GTTTTTAAAT	AATGTGATAG	AGAGATAGAT	20460
AATAGATAGA	TGGATACAGT	GATACAAATA	TAGTTTTTTT	TTTCAGTAAA	TATGAGGTTG	20520
ATTAAACCACT	TTTCCCTTTT	TAGGTTTTTT	TTTTTTTCCC	CTGTCCATGT	GGTTGCTGGG	20580
ATTGAAACTC	AGGACCCCTG	CAGGTCAACT	GGAAAACGTG	TTTTCTATAT	ATATAAATAG	20640
TGGTCTGTCT	GCTGTTTGT	TGTTTGTCTG	CTTGCTTGCT	TGCTTGCTTG	CTTGCTTGCT	20700
TGCTTTTTTT	TTTCTTCTGA	GACAGTATTT	CTCTGTGTAA	CCTGGTGCCC	TGAAACTCAC	20760

TCTGTAGACC	AGCCTGGCCT	CAATCGAACT	CAGAAATCCT	CCTGCCTCTT	GTCTACCTCC	20820
CAATTTTGGA	GTAAGGTGT	GCTACACCAC	TGCCTGGCAT	TATTATCAT	ATCATTATTA	20880
ATTTTATTAT	TAGACAGAAC	GAAATCAACT	AGTTGGTCCT	GTTTCGTTAA	TTCATTTGAA	20940
ATTAGTTGGA	CCAATTAGTT	GGCTGGTTTG	GGAGGTTTCT	TTTGTTTCCG	ATTTGGGTGT	21000
TTGTGGGGCT	GGGGATCAGG	TATCTCAACG	GAATGCATGA	AGGTTAAGGT	GAGATGGCTC	21060
GATTTTGTGA	AAGATTACTT	TTCTTAGTCT	GAGGAAAAAA	TAAAATAATA	TTGGGCTACG	21120
TTTCATGCT	TCATTTCTAT	TTCTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCAGATA	AGGAGGTCGG	21180
CCAGTTCCCTC	CTGCCTTCTG	GAAGATGTAG	GCATTGCATT	GGGAAAAGCA	TTGTTTGAGA	21240
GATGTGCTAG	TGAACCAGAG	AGTTTGGATG	TCAAGCCGTA	TAATGTTTAT	TACAATATAG	21300
AAAAAGTTCTA	ACAAAGTGAT	CTTTAACTTT	TTTTTTTTTT	TTTCTCCTTC	TACTTCTACT	21360
TGTTCTCACT	CTGCCACCAA	CGCGCTTTGT	ACATTGAATG	TGAGCTTTGT	TTTGCTTAAC	21420
AGACATATAT	TTTTTCTTTT	GGTTTGTCTT	GACATGGTTT	CCCTTCTTAT	CCGTGCAGGG	21480
TTCCAGACG	GCCTTTTGAG	AATAAAATGG	GAGGCCAGAA	CCAAAGTCTT	TTGAATAAAG	21540
CACCACAAC	CTAACCTGTT	TGGCTGTTTT	CCTTCCCAAG	GCACAGATCT	TTCCAGCAT	21600
GGAAAAGCAT	GTAGCAGTTG	TAGGACACAC	TAGACGAGAG	CACCAGATCT	CATTGTGGGT	21660
GGTTGTGAAC	CACCCACCAT	GTGGTTGCCT	GGGATTTGAA	CTCAGGATCT	TCAGAAGACG	21720
AGTCAGGGCT	CTAAACCGAT	GAGCCATCTC	TCCAGCCCTC	CTACATTCC	TCTTAAGGCA	21780
TGAATGATCC	CAGCATGGGA	AGACAGTCTG	CCCTCTTTGT	GGTATATCAC	CATATACTCA	21840
ATAAAATAAT	GAAATGAATG	AAGTCTCCAC	GTATTTAATT	CTTCGAGCTA	TCTAAATTCT	21900
CTCACAGCAC	CTCCCCCTCC	CCCACACTGC	CTTTCTCCCT	ATGTTTGGGT	GGGGCTGGGG	21960
GAGGGGTGGG	TGCGGGGCAG	GGATCTGCAT	GTCTTCTTGC	AGGTCTGTGA	ACTATTGCGG	22020
ATGGCTGGT	TCTCTGAACT	GTTGAGCCTT	GTCTATCCAG	AGGCTGACTG	GCTAGTTTTC	22080
TACCTGAAGT	CCCTGAGTGA	TGATTTCCCT	GTGAATTC			22118

配列番号： 1 7

配列の長さ： 4 2 9 9 9

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： G e n o m i c D N A

ハイボセティカル： N o

アンチセンス： N o

フラグメント型：

起源：

配列：

GCTGACACGC	TGTCCTCTGG	CGACCTGTCC	TCGGAGAGGT	TGGGCCTCCG	GATGCGCGCG	60
GGGCTCTGGC	CTCACGGTGA	CCGGCTAGCC	GGCCGCGCTC	CTGCCCTGAG	CCGCCTGCCG	120
CGGCCCGCGG	GCCTGCTGTT	CTCTCGCGCG	TCCGAGCGTC	CCGACTCCCG	GTGCCGGCCC	180
GGGTCCGGGT	CTCTGACCCA	CCCGGGGGCG	GCGGGGAAGG	CGGCGAGGGC	CACCGTGCCC	240
CGTGCGCTCT	CCGCTGCGGG	CGCCCCGGGC	GCCGCACAAC	CCCACCCGCT	GGCTCCGTGC	300
CGTGCGTGTC	AGGCGTTCTC	GTCTCCGCGG	GGTTGTCCGC	CGCCCCCTCC	CCGGAGTGCG	360
GGGTGGCCGG	AGCCGATCGG	CTCGCTGGCC	GGCCGGCCTC	CGCTCCCGGG	GGGCTCTTCG	420
ATCGATGTGG	TGACGTCGTG	CTCTCCCGGG	CCGGGTCCGA	GCCGCGACGG	GCGAGGGGCG	480
GACGTTCTGT	GCGAACGGGA	CCGTCTCTCT	CGCTCCGCCC	GCGCGGTCCC	CTCGTCTGCT	540
CCTCTCCCCG	CCCGCCGGCC	GGCGTGTGGG	AAGGCGTGGG	GTGCGGACCC	CGGCCCGACC	600
TCGCCGTCCC	GCCGCGCGCC	TTCGCTTCGC	GGGTGCGGGC	CGGCGGGGTC	CTCTGACGCG	660
GCAGACAGCC	CTGCCTGTCC	CCTCCAGTGG	TTGTGCGACT	GCGGGCGGCC	CCCTCTCCGCG	720
GCGGTGGGGG	TGCCGTCCCG	CCGGCCCGTC	GTGCTGCCCT	CTCGGGGGGG	GTTTGCGCGA	780
GCGTCCGGTC	CGCTTGGGCC	CTTGCGGTGC	TCCTGGAGCG	CTCCGGGTTC	TCCCTCAGGT	840
GCCCGAGGCC	GAACGGTGGT	GTGTGCTTCC	CGCCCCCGGC	GCCCCCTCCT	CCGGTCGCGG	900
CCGCGGTGTC	CGCGCGTGGG	TCCTGAGGGA	GCTCGTCCGT	GTGGGGTTCC	AGGCGGTTTG	960
AGTGAGACGA	GACGAGACGC	GCCCCCTCCA	CGCGGGGAAG	GGCGCCCGCC	TGCTCTCGGT	1020
GAGCGCACGT	CCCGTGCTCC	CCTCTGGCGG	GTGCGCGCGG	GCCGTGTGAG	CGATCGCGGT	1080
GGGTTCCGGC	CGGTGTGACG	CGTGCGCCGG	CCGGCCCGCC	AGGGGCTGCC	GTTCTGCCTC	1140
CGACCGGTCC	TGTGTGGGTT	GACTTCGGAG	GCGCTCTGCC	TCGGAAGGAA	GGAGGTGGGT	1200
GGACGGGGCG	GCCTGGTGGG	GTTGCGCGCA	CGCGCGCACC	GGCCGGGCCC	CCGCCCTGAA	1260

CGCGAAGCCT	CGAGGTGGCC	GCGCGCAGGT	GTTTCCTCGT	ACCGCAGGGC	CCCCCTCCTT	1320
CCCCAGGCGT	CCCTCGGGCG	CTCTGCGGGC	CCGAGGAGGA	GCGGCTGGCG	GGTGGGGGGA	1380
GTGTGACCCA	CCCTCGGTGA	GAAAAGCCTT	CTCTAGCGAT	CTGAGAGGCG	TGCTTTGGGG	1440
GTACCGGATC	CCCGGGGCGC	CCGCTCTGT	CTCTGCCCTC	GTTATGGTAG	CGCTGCCGTA	1500
GCGACCCGCT	CGCAGAGGAC	CCTCCTCCGC	TTCCCCCTCG	ACGGGGTTGG	GGGGGAGAAG	1560
CGAGGGTTCC	GCCGGCCACC	GCGGTGGTGG	CCGAGTGCGG	CTCGTCGCCT	ACTGTGGCCC	1620
GCGCTCCCC	CTTCCGAGTC	GGGGGAGGAT	CCCGCCGGGC	CGGGCCCGGC	GCTCCCACCC	1680
AGCGGGTTGG	GACGCGGCGG	CCGGCGGGCG	GTGGGTGTGC	GCGCCCGGCG	CTCTGTCCGG	1740
CGCGTGACCC	CCTCCGTCCG	CGAGTCGGCT	CTCCGCCCGC	TCCCGTGCCG	AGTCGTGACC	1800
GGTGCCGACG	ACGCGTTTTG	CGTGGCACGG	GGTCGGGGCC	GCCTGGCCCT	GGGAAAGCGT	1860
CCCACGGTGG	GGGCGCGCCG	GTCTCCCCGA	GCGGGACCGG	GTGGGAGGAT	GGACGAGAAT	1920
CACGAGCGAC	GGTGGTGGTG	GCGTGTCCGG	TTCTGTGGTG	CGGTGCTCTC	GGGGCCCCCG	1980
GTGGCGGGGC	CCCGGGGCTC	GCGAGGCGGT	TCTCGGTGGG	GGCCGAGGGC	CGTCCGGCGT	2040
CCCAGGCGGG	GCGCCGCGGG	ACCGCCCTCG	TGTCTGTGGC	GGTGGGATCC	CGCGGCCGTG	2100
TTTTCTTGTT	GGCCCCGGCG	TGCCTGAGGT	TTCTCCCCGA	GCCGCCGCCT	CTGCGGGCTC	2160
CGGGCGGGGC	TTGCCCTCGC	GGTCCCCGGC	CTGTGCCCTC	CTGTGCCCTC	TTCCCCGCCC	2220
GCCGCCCGCC	GATCCTCTTC	TTCCCCCGGA	GCGGCTCACC	GGCTTCACGT	CCGTGTGGTG	2280
CCCCGCTTGG	GACCGAACC	GGCACCGCC	CGTGGGGCGC	CGCCGCGCGC	CACTGATCGG	2340
CCGGCGGTCC	GCGTCCCCCG	GCGCGCGCCT	GCGCGACCGG	GTCCGTGGCG	CGCCGCGTGG	2400
GGCCCCGGTG	GCTTCCCGGA	GGGTTCGGGG	GGTCGGCCTG	CGGCGCGTGC	GGGGGAGGAG	2460
ACGTTTCCGG	GGGACCGGCC	GCGGCTGCGG	CGGCGGCGGT	GGTGGGGGGA	GCCGCGGGGA	2520
TGCGCGAGGG	CCGTCGGGCC	GCCCCGGGTG	CGCCCGCGTG	CCGCCGCGCG	CGGTGAGGCC	2580
CCGCGCGTGT	GTCCCGGCTG	CGGTGCGCGG	CGCTCGAGGG	GTCCCGGTGG	CGTCCCTTTC	2640
CCCGCCGGCC	GGCTTTCTCG	CGCCTTCCCC	GTGCCCCCGG	CCTCGCCCGT	GGTCTCTCGT	2700
CTTCTCCCGG	CCCGCTCTTC	CGAACCGGGT	CGCCGCGTCC	CCCGGGTGCG	CCTCGCTTCC	2760
CGGGCCTGCC	GCGGCCCTTC	CCCGAGGCGT	CGTCCCGGG	CGTCCGCGTC	GGGGAGAGCC	2820
CGTCTCCCC	GCGTGGCGTC	GCCCCGTTCC	GCGCGCGCGT	GCGCCCGAGC	GCGGCCCGGT	2880
GGTCCCTCCC	GGACAGGCGT	TGCTGCGACG	TGTGGCGTGG	GTCCGACCTC	GCTTGGCCGG	2940
TGCTGCGCCC	TCGCCCGGG	TGCGGGGGTG	GGGCCCGGGC	CGGGGCCCTC	GCCCCGGTCC	3000
CTGCTTCCCG	TCCCGGGCGG	GGCGGGGCGC	GCCGGCCGGC	CTCGGTCGCC	CTCCCTTGGC	3060
CGTCGTGTGG	CGTGTGCCAC	CCCTGCGCCG	GCGCCCGCCG	GCGGGGCTCG	GAGCCGGGCT	3120
TCGGCGGGGC	CCCGGGCCCT	CGACCGGACC	GGCTGCGCGG	GCGCTGCGGC	CGCACGGCGC	3180
GACTTCCCC	GGGCCGGGCA	CCGCGGTCCG	CCTCTCGCTC	GCCGCCCGGA	CGTCGGGGCC	3240
GCCCGCCGGG	CGGGGCGGAG	CGCGTCTCCC	GCCTCGCCGC	CGCCCGCCGG	CGCCGGCCGC	3300
GCGCGCGCGC	GCGTGGCCGC	CGGTCCCTCC	CGGCCGCGCG	GCGCGGGTCC	GGCCGTCCGC	3360
CTCTTCGCGG	GCGGGCGCGA	CGAAGAAGCG	TGCGGGGTCT	GTGGCGCGGG	GCCCCGGGTG	3420
GTGCGTTCGG	GTGGGGGGCG	GGTGGTTGGG	GCGTCCGGTT	CGCCGCGCCC	CGCCCCGGCC	3480
CCACCGGTCC	CGGCCGCGCG	CCCCGCGCCC	GCTCGCTCCC	TCCCGTCCCG	CCGTCCCGCG	3540
CCCGTCCGTC	GTCCTGTCGG	TGCTCCTCCT	CGCTTGCGGG	GCGCCGGGCC	CGTCTCGCG	3600
AGGCCCCCCG	GCCGCGCCGT	CGGCCGCGTC	GGGGGCTCGC	CGCGCTCTAC	CTTACCTACC	3660
TGGTTGATCC	TGCCAGTAGC	ATATGCTTGT	CTCAAAGATT	AAGCCATGCA	TGTCTAAGTA	3720
CGCACGGCCG	GTACAGTGAA	ACTGCGAATG	GCTCATTAAA	TCAGTTATGG	TTCTTTGGGT	3780
CGCTCGCTCC	TCTCCTACTT	GGATAACTGT	GGTAATTCTA	GAGCTAATAC	ATGCCGACGG	3840
GCGCTGACCC	CCTTCGCGGG	GGGGATGCGT	GCATTTATCA	GATCAAAACC	AACCCGGTCA	3900
GCCCCTCTCC	GGCCCCGGCC	GGGGGGCGGG	CGCCGGCGGC	TTTGGTGACT	CTAGATAACC	3960
TCGGGCGGAT	CGCACGCCCC	CCGTGGCGGC	GACGACCCAT	TCGAACGTCT	GCCCTATCAA	4020
CTTTTCGATG	TAGTCGCCGT	GCCTACCATG	GTGACCACGG	GTGACGGGGA	ATCAGGGTTC	4080
GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT	ACCACATCCA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGCA	4140
AATTACCCAC	TCCCGACCCG	GGGAGGTAGT	GACGAAAAAT	AACAATACAG	GACTCTTTCG	4200
AGGCCCTGTA	ATTGGAATGA	GTCCACTTTA	AATCCTTTAA	CGAGGATCCA	TTGGAGGGCA	4260
AGTCTGGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATTCCA	GCTCCAATAG	CGTATATTAA	AGTTGCTGCA	4320
GTAAAAAGC	TCGTAGTTGG	ATCTTGGGAG	CGGGCGGGCG	GTCCGCGCGC	AGGCGAGCCA	4380
CCGCCCGTCC	CCGCCCTTGG	CCTCTCGGCG	CCCCCTCGAT	GCTCTTAGCT	GAGTGTCCCG	4440
CGGGGCGCGA	AGCGTTTACT	TTGAAAAAAT	TAGAGTGTTC	AAAGCAGGCC	CGAGCCGCC	4500
GGATACCGCA	GCTAGGAATA	ATGGAATAGG	ACCGCGGTTT	TATTTTGTGG	GTTTTTCGAA	4560
CTGAGGCCAT	GATTAAAGAG	GACGGCCGGG	GGCATTCTGA	TTGCGCCGCT	AGAGGTGAAA	4620
TTCTTGGACC	GGCGCAAGAC	GGACCAAGAG	GAAAGCATT	GCCAAGAATG	TTTTTCATTAA	4680
TCAAGAACGA	AAGTCGGAGG	TTGGAAGACG	ATCAGATACC	GTCCGTAGTTC	CGACCATAAA	4740
CGATGCCGAC	CGCGATGCG	GCGGCGTTAT	TCCCATGACC	CGCCGGGCAG	CTTCCGGGAA	4800
ACCAAAGTCT	TTGGGTTCGG	GGGGGAGTAT	GGTTGCAAA	CTGAAACTTA	AAGGAATTGA	4860
CGGAAGGGCA	CCACCAGGAG	TGGAGCCTGC	GGCTTAATTT	GACTCAACAC	GGGAAACCTC	4920

ACCCGGCCCG	GACACGGACA	GGATTGACAG	ATTGATAGCT	CTTTCTCGAT	TCCGTGGGTG	4980
GTGGTGCATG	GCCGTTCCTTA	GTTGGTGGAG	CGATTTGTCT	GGTTAATTCC	GATAACGAAC	5040
GAGACTCTGG	CATGCTAACT	AGTTACGGCA	CCCCGAGCG	GTCCGGCTCC	CCCAACTTCT	5100
TAGAGGGACA	AGTGGCGTTC	AGCCACCCGA	GATTGAGCAA	TAACAGGTCT	GTGATGCCCT	5160
TAGATGTCCC	GGGCTGCACG	CCCGCTACAC	TGACTGGCTC	AGCGTGTGCC	TACCTACGC	5220
CGGCAGGCGC	GGGTAACCCG	TGAAACCCCA	TTCGTGATGG	GGATCGGGGA	TTGCAATTAT	5280
TCCCCATGAA	CGAGGGAATT	CCCGAGTAAG	TGCGGGTCAT	AAGCTTGCGT	TGATTAAAGTC	5340
CCTGCCCTTT	GTACACACCG	CCCGTCGCTA	CTACCGATTG	GATGGTTTAG	TGAGGCCCTC	5400
GGATCGGCCC	CGCCGGGGTC	GGCCCCACGC	CCTGGCGGAG	CGCTGAGAAG	ACGGTCGAAC	5460
TTGACTATCT	AGAGGAAGTA	AAAGTCGTAA	CAAGGTTTCC	GTAGGTGAAC	CTGCGGAAGG	5520
ATCATTAACG	GAGCCCGGAG	GGCGAGGCCC	GCGGCGGCGC	CGCCGCGGCC	GCGCGCTTCC	5580
CTCCGCACAC	CCACCCCCCC	ACCGCGACGC	GGCGCGTGCG	CGGGCGGGGC	CCGCGTGCCC	5640
GTTGCTTCGC	TCGCTCGTTC	GTTCGCGCCC	CGGCCCGGCC	GCCGCGAGAG	CCGAGAACTC	5700
GGGAGGGAGA	CGGGGGGGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAA	5760
AGAAGGGCGT	GTCGTTGGTG	TGCGCGTGTC	GTGGGGCCGG	CGGGCGGGCG	GGAGCGGTCC	5820
CCGCGCCGCG	CCCGACGAC	GTGGGTGTCG	GCGGGCGCGG	GGGCGGTCT	CGGCGCGCTC	5880
GCGGCGGGTC	TGGGGGGGTC	TGCGTGCCCT	CCTCCCCGCC	GGGGCCCGTC	GTCCGGCCCC	5940
GCCGCGCGCG	CTCCCCGTCT	TGCGGGCCGG	CCGGATTCCC	GTCCGCTCCG	CCGCGCCGCT	6000
CCGCGCCGCC	GGGACGGGCC	CCGCTCGCTC	TCCCCGGCCT	TCCCGCTAGG	GCGTCTCGAG	6060
GGTCGGGGGC	CGGACGCCGG	TCCCTCCCCC	CGCCTCCTCG	TCCGCCCCCC	CGCCGTCCAG	6120
GTACCTAGCG	CGTTCCGGCG	CGGAGGTTTA	AAGACCCCTT	GGGGGGATCG	CCCGTCCGCC	6180
CGTGGGTCCG	GGGCGGTGGT	GGGCCCCGCG	GGGAGTCCCG	TCCGGAGGGG	CCCGGCCCTC	6240
CCCGCGCCTC	CACCGCGGAC	TCCGCTCCCC	GGCCGGGGCC	GCGCCGCCGC	CGCCCGCCGC	6300
GCGGCGGTCC	GGTGGGGGCT	TTACCCGGCG	GCCGTCCGCG	GCCGTCCGCG	CGTGTGCGCT	6360
GCGCCCCGCG	CCGTGGGGGC	GGGAACCCCC	GGGCGCCTGT	GGGGTGGTGT	CCGCGCTCGC	6420
CCCCCGGTGG	GCGGCGCGCG	CCTCCCCGTG	GTGTGAAACC	TTCCGACCCC	TCTCCGGAGT	6480
CCGGTCCCGT	TTGCTGTCTC	GTCTGGCCGG	CCTGAGGCAA	CCCCCTCTCC	TCTTGGGCGG	6540
GGGGGGCGGG	GGGACGTGCC	GCGCCAGGAA	GGGCCTCCTC	CCGGTGCGTC	GTCCGGAGCG	6600
CCCTCGCCAA	ATCGACTTCG	TACGACTCTT	AGCGGTGGAT	CACTCGGCTC	GTGCGTCCAT	6660
GAAGAACGCA	GCTAGCTGCG	AGAAATTAAT	TGAATTGCAG	GACACATTGA	TCATCGACAC	6720
TTCCGAACGCA	CTTGCGGCC	CGGCTTCCTC	CGGGGCTAC	GCCCTGTCTGA	GCGTCCGCTG	6780
CCGATCAATC	GCCCCGGGGG	TGCTTCCGGG	CTCCTCGGGG	TGCGCGGGCTG	GGGGTTCCCT	6840
CGCAGGGCCC	GCCGGGGGCC	CTCCGTCCCC	CTAAGCGCAG	ACCCGGCGGC	GTCCGCCCTC	6900
CCTTTCGCCG	CGCGCCCGCC	CCTTCCCCCT	CCCCCGCGCG	GCCCTGCGTG	GTACGCGCTC	6960
GGGTGCGGGG	GGGGAGAGGG	GGGCGCGCCC	GGCTGAGAGA	GACGGGGAGG	GCGGCGCCGC	7020
CGCCGGAAGA	CGGAGAGGGA	AAGAGAGAGC	CGGCTCGGGC	CGAGTTCCCG	TGGCCGCGCG	7080
CTGCGGTCCG	GGTTCCCTCC	TGGGGGGGCT	CCCTCGCGCC	GCGCGCGGCT	CGGGGTTCGG	7140
GGTTCGTCGG	CCCCGGCCGG	GTGGAAGGTC	CCGTGCCCCG	CGTCGTCTGC	GTGCGCGCTC	7200
GTCCGGCGTG	GGGGCGTGTG	GCGTGCCTGT	TGGTGTGGG	GGAGGAGGAA	GGCGGGTCCG	7260
GAAGGGGAAG	GGTGCCCGCG	GGGAGAGAGG	GTCGGGGGAG	CGCGTCCCGG	TGCGCCGCGT	7320
TCCGCCGCCG	CCCCCGGCTG	GCGGCGCGGC	GTCCGGCCGA	CCGGCCGCTC	CCCGCGCCCC	7380
TCCTCTCTCC	CGCCGCCCTC	CCTCCGAGGC	CGCCCGCGTC	CTCCTCGCCC	TCCCGCGCGG	7440
TACGCGCGCG	CGCCCGCCCC	CCCGGCTCGC	CTCGCGCGCG	GTGTCGCCGG	GCCGGGAGCC	7500
CGCCCCGCGG	CCCGCCCGTG	GCCGCGCGCG	CGGGGTTCGC	GTGTCCCCGG	CGGCGACCCG	7560
CGGGACGCGG	CGGTGTCGTC	CGCCGTGCGG	CGCCCGCCTC	CGGCTCGCGG	CCGCGCCCGG	7620
CCGCGCCGGG	GCCCCGTCCC	GAGCTTCCGC	GTCCGGGCGG	CGCGGCTCCG	CCGCGCGCTC	7680
CTCGGACCCG	TCCCCCCGAC	CTCCGCGGGG	GAGACGCGCC	GGGGCGTGCG	GCGCCCCGTC	7740
CGCCCCCGGC	CCGTGCCCCCT	CCCTCCGCTC	GTCCCGCTCC	GCGGGGGCGG	CGCGGGGGCG	7800
CGGTGCGCGG	CGCGCTCTCT	CTCCCGTCCG	CTCTCCCCCT	CGCCGGGGCC	GTCTCCCGAC	7860
GGAGCGTCCG	GCGGGCGGTC	GGGCGGGCGC	GATTCCGTCC	GTCCGTCCGC	CGAGCGGCC	7920
GTCCCCCTCC	GAGACGCGAC	CTCAGATCAG	ACGTGGCGAC	CCGCTGAATT	TAAGCATATT	7980
AGTCAGCGGA	GGAAAAGAAA	CTAACAGGGA	TTCCCTCAGT	AACGGCGAGT	GAACAGGGAA	8040
GAGCCCAGCG	CCGAATCCCC	GCCCCGCGGG	GCGCGGGACA	TGTGGCGTAC	GGAAGACCCG	8100
CTCCCCGGCG	CGCTCTGTGG	GGGGCCCAAG	TCTTCTGAT	CGAGGCCAG	CCCGTGGACG	8160
GTGTGAGGCC	GGTAGCGGCC	GCGCGCGCGC	CGGGTCTTCC	CGGAGTCGGG	TTGCTTGGGA	8220
ATGCAGCCCA	AAGCGGGTGG	TAAACTCCAT	CTAAGGCTAA	ATACCGGCAC	GAGACCGATA	8280
GTCAACAAGT	ACCGTAAGGG	AAAGTTGAAA	AGAACTTTGA	AGAGAGAGTT	CAAGAGGGCG	8340
TGAAACCGTT	AAGAGGTAAA	CGGGTGGGGT	CCCGCAGTTC	CGCCCGGAGG	ATTCAACCCG	8400
GCGGCGGGTC	CGGCCGTGTC	GCGGGCCCGG	CGGATCTTTC	CCGCCCCCGG	TTCTTCCCGA	8460
CCCCCTCACG	CGCCCTCCCT	TCCCCCGCCG	CCCTCTCTCC	TCCTCCCCGG	AGGGGGCGGG	8520
CTCCGGCGGG	TGCGGGGGTG	GGCGGGCGGG	GCCGGGGGTG	GGGTCCGGCG	GGGACCGTCC	8580

CCCGACCGGC	GACCGGCGGC	CGCGGGGCGC	ATTTCCACCG	CGCGGGTGCG	CCGCGACCGG	8640
CTCCGGGACG	GCTGGGAAGG	CCCGGGCGGG	AAGGTGGCTC	GGGGGGCCCC	GTCCGTCCGT	8700
CCGTCTCTCT	CCTCCCCCGT	CTCCGCCCCC	CGGCCCGCGG	TCCTCCCTCG	GGAGGGCGCG	8760
CGGGTCGGGG	CGCGGGCGGC	GGCGGGCGTG	GCGGCGCGGG	CGGGGGCGGC	GGGACCGAAA	8820
CCCCCCCCGA	GTGTTACAGC	CCCCCGGCA	GCAGCACTCG	CCGAATCCCG	GGGCGGAGGG	8880
AGCGAGACCC	GTGCGCGCGC	TCTCCCCCT	CCCGGCGCCC	ACCCCGCGCG	GGAATCCCCC	8940
CGGAGGGGGG	TCTCCCCCGC	GGGGGCGGCG	CGCGTCTCC	TCGTGGGGGG	GCCGGGCCAC	9000
CCCTCCCACG	GCGCGACCGC	TCTCCCACCC	CTCTCCCCCG	CGCCCCCGCC	CCGGCGACGG	9060
GGGGGGTGCC	GCGCGCGGGT	CGGGGGGCGG	GCGGACTGT	CCCCAGTGCG	CCCCGGGCGG	9120
GTCCGCGCGT	CGGGCCCGGG	GGAGGTTCTC	TCGGGGCCAC	GCGCGCGTCC	CCCGAAGAGG	9180
GGGACGGCGG	AGCGAGCGCA	CGGGGTCGGC	GGCGACGTCG	GCTACCCACC	CGACCCGTCT	9240
TGAAACACGG	ACCAAGGAGT	CTAACACGTG	CGCGAGTCGG	GGGCTCGCAC	GAAAGCCCGC	9300
GTGGCGCAAT	GAAGGTGAAG	GCCGGCGCGC	TCGCCGGCCG	AGGTGGGATC	CCGAGGCCCT	9360
TCCAGTCCGC	CGAGGGCGCA	CCACCGGCCC	GTCTCGCCCG	CCGCGCCGGG	GAGGTGGAGC	9420
ACGAGCGCAC	GTGTTAGGAC	CCGAAAGATG	GTGAACATATG	CCTGGGCAGG	GCGAAGCCAG	9480
AGGAAACTCT	GGTGGAGGTC	CGTAGCGGTG	CTGACGTGCA	AATCGGTCTG	CCGAGGCTGG	9540
TATAGGGGCG	AAAGACTAAT	CGAACCATCT	AGTAGCTGGT	TCCCTCCGAA	GTTTCCCTCA	9600
GGATAGCTGG	CGCTCTCGCA	GACCCGACGC	ACCCCGCCCA	CGCAGTTTTA	TCCGGTAAAG	9660
CGAATGATTA	GAGGTCTTGG	GGCCGAAACG	ATCTCAACCT	ATTCTCAAAC	TTTAAATGGG	9720
TAAGAAGCCC	GGCTCGCTGG	CGTGGAGCCG	GGCGTGAAT	GCGAGTGCCT	AGTGGGCCAC	9780
TTTTGGTAAG	CAGAACTGGC	GCTGCGGGAT	GAACCGAACG	CCGGGTAAAG	GCGCCCGATG	9840
CCGACGCTCA	TCAGACCCCA	GAAAAGGTGT	TGGTTGATAT	AGACAGCAGG	ACGGTGGCCG	9900
TGGAAGTCGG	AATCCGCTAA	GGAGTGTGTA	ACAACCTACC	TGCCGAATCA	ACTAGCCCTG	9960
AAAATGGATG	GCGCTGGAGC	GTCCGGGCCA	TACCCGGCCG	TCGCCGGCAG	TCGAGAGTGG	10020
CGGGGACCGG	CGGGGGCGGC	GCGCGCGCGC	GCGCGTGTGG	TGTGCGTCCG	AGGGCGGCGG	10080
CGCGCGCGGC	GCGGGGGGTG	TGGGGTCCCT	CCCCCGCCCC	CCCCCCCCAC	CCTCCTCCCC	10140
TCCTCCCCGC	CACGCCCCGC	TCCCCGCCCC	CGGAGCCCCG	CGGACGCTAC	GCCGCGACGA	10200
GTAGGAGGGG	CCCTGCGGTG	AGCCTTGAAG	CCTAGGCGCG	GGGCCCCGGT	GGAGCCCGCG	10260
CAGGTGACAG	TCTTGGTGTT	AGTAGCAAAT	ATTCAAACGA	GAACTTTGAA	GGCCGAAGTG	10320
GAGAAGGGTT	CCATGTGAAC	AGCAGTTGAA	CATGGGTGAG	TCGGTCTCTG	GAGATGGGCG	10380
AGCGCCGTTT	CGAAGGGACG	GGCGATGGCC	TCCGTTGCCC	TCGGCCGATC	GAAAGGGAGT	10440
CGGGTTTACA	TCCCCGAATC	CGGAGTGGCG	GAGATGGGCG	CCGCGAGGCG	TCCAGTGCAG	10500
TAACGCGACC	GATCCCGGAG	AAGCCGCGCG	GAGCCCCGGG	GAGAGTTCTC	TTTCTTTTGT	10560
GAAGGGCAGG	GCGCCCTGGA	ATGGGTTTCG	CCGAGAGAGG	GGGCCCCGTG	CTTGGAAGAG	10620
GTCCGCGTTC	CGCGCGCGTC	CGGTGAGTCT	TCGCTGGCCC	TTGAAAATCC	GGGGGAGAGG	10680
GTGTAAATCT	CGCGCCGGGC	CGTACCCATA	TCCGAGCAGG	GTCTCCAAGG	TGAACAGCCT	10740
CTGGCATGTT	GGAAACAATG	AGGTAAGGGA	AGTCGGCAAG	CCGGATCCGT	AACTTCGGGA	10800
TAAGGATTGG	CTCTAAGGGC	TGGGTCCGTC	GGGTGCGGCG	GCGAAGCGGG	GCTGGGCGCG	10860
CGCCGCGCCT	GGACGAGGCG	CGCGCCCCCC	CCACGCCCCG	GGCACCCCCC	TCGCGGCCCT	10920
CCCCCGCCCC	ACCCGCGCGC	GCCGCTCGCT	CCCTCCCCAC	CCCGCGCCCT	CTCTCTCTCT	10980
CTCTCCCCCG	CTCCCCGTCC	TCCCCCTCC	CCGGGGGAGC	GCCGCGTGGG	GGCGCGGCGG	11040
GGGAGAAAGG	GTCCGGGCGG	CAGGGGCGCG	GCGGCGGCGG	CCGGGGCGGC	CGGCGGGGCG	11100
AGGTCCCCCG	GAGGGGGGCG	CCGGGGACCC	GGGGGGCGCG	CGGCGGCGCG	GACTCTGGAC	11160
GCGAGCCGGG	CCCTTCCCGT	GGATCGCCCC	AGCTGCGGCG	GGCGTCCGCG	CCGCCCCCGG	11220
GGAGCCCGGC	GGCGGCGCGG	CGCGCCCCCC	ACCCCAACCC	CACGTCTCGG	TCGCGCGCGG	11280
GTCCGCTGGG	GGCGGGAGCG	GTCGGGCGGC	GGCGGTCCGC	GGGCGGCGGG	GCGGGGCGGT	11340
TCGTCCCCCC	GCCCTACCCC	CCCGGCCCCG	TCCGCCCCCC	GTTCCCCCCT	CCTCCTCGGC	11400
GCGCGGCGGC	GGCGGCGGCA	GGCGGCGGAG	GGGCGGCGGG	CCGTTCCCCC	CCGCGGGGTC	11460
CGCCCCCGGG	GCGCGCGGTC	GCGCGCGCGC	TCGCCTCGGC	CGGCGCTAG	CAGCCGACTT	11520
AGAACTGGTG	CGGACCAAGG	GAATCCGACT	GTTTAATTAA	AACAAAGCAT	CGCGAAGGCC	11580
GCGCGGCGGT	GTTGACGCGA	TGTGATTCTT	GCCCAGTGCT	CTGAATGTCA	AAGTGAAGAA	11640
ATTCAATGAA	GCGCGGGTAA	ACGGCGGGAG	TAACATATGAC	TCTCTTAAGG	TAGCCAAATG	11700
CCTCGTCATC	TAATTAGTGA	CGCGCATGAA	TGGATGAACG	AGATTCCCAC	TGTCCCTACC	11760
TACTATCCAG	CGAAACCACA	GCCAAGGGAA	GCGGCTTGGC	GGAAATCAGC	GGGAAAGAAG	11820
ACCTTGTTGA	GCTTGACTCT	AGTCTGGCAC	GGTGAAGAGA	CATGAGAGGT	GTAGAATAAG	11880
TGGGAGGCCC	CGGCGGCCCC	CCCGGTGTCC	CCCGAGGGGG	CCCGGGGCGG	GCTCCGCGCG	11940
CCTGCGGGCC	GCCGGTGAAG	TACCACTACT	CTGATCGTTT	TTTCACTGAC	CCGGTGAGGC	12000
GGGGGGGCGA	GCCCGAGGGG	CTCTCGCTTC	TGGCGCCAAG	CGCCCGCCCG	GCCGGGCGCG	12060
ACCCGCTCCG	GGGACAGTGC	CAGGTGGGGA	GTTTGAATGG	GGCGGTACAC	CTGTCAAACG	12120
GTAAACGACG	TGTCTTAAGG	CGAGCTCAGG	GAGGACAGAA	ACCTCCCGTG	GAGCAGAAGG	12180
GCAAAAGCTC	GCTTGATCTT	GATTTTCAGT	ACGAAATACAG	ACCGTGAAAG	CGGGGCTCTA	12240

CGATCCTTCT	GACCTTTTGG	GTTTTAAGCA	GGAGGTGTCA	GAAAAGTTAC	CACAGGGATA	12300
ACTGGCTTGT	GGCGGCCAAG	CGTTCATAGC	GACGTCGCTT	TTTGATCCTT	CGATGTCGGC	12360
TCTTCCTATC	ATTGTGAAGC	AGAATTCCGC	AAGCGTTGGA	TTGTTACCCC	ACTAATAGGG	12420
AACGTGAGCT	GGGTTTAGAC	CGTCGTGAGA	CAGGTTAGTT	TTACCCCTACT	GATGATGTGT	12480
TGTTGCCATG	GTAATCCTGC	TCAGTACGAG	AGGAACCGCA	GGTTCAGACA	TTTGGTGTAT	12540
GTGCTTGGCT	GAGGAGCCAA	TGGGGCGAAG	CTACCATCTG	TGGGATTATG	ACTGAACGCC	12600
TCTAAGTCAG	AATCCCGGCC	AGGCGAACGA	TACGGCAGCG	CCGCGGAGCC	TGGGTTGGCC	12660
TGGGATAGCC	GGTCCCCCGC	CTGTCCCCGC	CGGCGGGCCG	CCCCCCCCCTC	CACGAGCCCC	12720
GCGCGCGGAG	GGCGCGTGCC	CCGCGCGCGC	CCGGGACCGG	GGTCCGGTGC	GGAGTGCCCT	12780
TGCTCCTGGG	AAACGGGGCG	CGGCGGAAA	GGCGGCGGCC	CCCTCGCCCG	TCACGCACCG	12840
CACGTTCTGT	GGGAACCTGG	CGCTAAACCA	TTCTGTAGAC	ACCTGCTTCT	GGGTCCGGGT	12900
TTCTGTACGT	GCAGAGCAGC	TCCCTCGCTG	CGATCTATTG	AAAGTCAGCC	CTCGACACAA	12960
GGGTTTGTCC	GCGCGCGCGT	GCGTGCGGGG	GGCCCGGCGG	GCGTGCGCGT	TGGGCGCCGT	13020
CCGTCTTTC	GTTCTGTCTC	CTCCCTCCCG	GCCTCTCCCG	CCGACCGCGG	CGTGGTGGTG	13080
GGGTGGGGGG	GAGGGCGCGC	GACCCCGGTC	GGCCGCCCCG	CTTCTTCGGT	TCCCGCCTCC	13140
TCCCCGTTC	GCGCGGGGCG	GCTCGTCCGC	TCCGGGCCGG	GACGGGGTCC	GGGGAGCGTG	13200
GTTTGGGAGC	CGCGGAGGCG	CCGCGCCGAG	CCGGGCCCCG	TGGCCCGCCG	GTCCCCGTCC	13260
CGGGGGTTGG	CCGCGCGCGC	CGGTGGGGGG	CCACCCGGGG	TCCCGGCCCT	CGCGCGTCTC	13320
TCTCTCTCGC	TCTTCCGCAC	GGGTCCGACC	ACGAACCCCG	GGTGGCGGGC	GGCGGGCGGC	13380
GAGCCCCACG	GGCGTCCCCG	CACCCGGCCG	ACCTCCGCTC	GCGACCTCTC	CTCGGTCCGG	13440
CCTCCGGGGT	CGACCGCCTG	CGCCCGCGGG	CGTGTAGACTC	AGCGGCGTCT	CGCCGTGTCT	13500
CGGGTCCGAC	CGCGCCTTCT	CCACCGAGCG	GCGGTGTAGG	AGTGCCCGTC	GGGACGAACC	13560
GCAACCGGAG	CGTCCCCGTC	TCGGTCCGCA	CCTCCGGGGT	CGACCAAGCTG	CCGCCCGCGA	13620
GCTCCGGACT	TAGCCGGCGT	CTGCACGTGT	CCCGGGTCTGA	CCAGCAGGCG	GCCGCCGGAC	13680
GCAGCGGGCG	ACGCACGCGA	GGGCGTCCAT	TCCCTTCGCG	GCGCCCGCGC	TCCACCCGCG	13740
CTCGGCCCGC	GGTGGAGCTG	GGACCACGCG	GAACCTCCCTC	TCCACATTTT	TTTTCAGCCC	13800
CACCGCGAGT	TTGCGTCCGC	GGGACCTTTA	AGAGGGAGTC	ACTGCTGCCG	TCAGCCAGTA	13860
CTGCCCTCCT	CTTTTTCGCT	TTTAGGTTTT	GCTTGCCCTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	13920
TTTTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CGCTTTCTTT	13980
CTTCTTTGTG	TCTCTTCTTG	CTCTTCTCTT	GTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTGT	14040
CTCTCGCTCT	CGCCCTCTCT	CTCTTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTG	TCTCTCGCTC	14100
TGCGCCTCTC	TCTCTCTCTT	CTCTCTGTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	14160
GTCTCTCTCT	CCCTCTCTCT	CTCTCTCTGT	CTCTCTCTGT	CTCTCTCTGT	CTCTCTCTGT	14220
CCCTCCCTCC	CTCCCTCCCT	CCCTCCCTCT	CCTTGGCGCC	TTCTCGGCTC	TTGAGACTTA	14280
GCCGCTGTCT	CGCCGTACCC	CGGAGCCGCC	GGCGGGCCCT	CTCCACCGAG	CGGCGTGCCA	14340
CAGTGCCCGT	CGGGACGAGC	AGCTCCGGAC	CGGTCCCGCT	CTCGGTCCGG	ACCTCCGGGG	14400
TCGACCAAGT	GCCGCGCGCG	AGCTCCGGAC	TTAGCCGGCG	TCTGCACGTC	TCCCGGGTCG	14460
ACCAGCAGGC	GGCCGCGCGA	CGCAGCGGCG	CACCGACGGA	GGGCGCTGAT	TCCCGTTTCC	14520
GCGCCCGCGC	CTCCACCGGC	CTCGGCGCGC	CGTGGAGCTG	GGACCAACGG	GAACCTCCCTC	14580
TCTTACATTT	TTTTACAGCC	CACCGCGAGT	TTGCGTCCGC	GGGACCTTTA	AGAGGGAGTC	14640
ACTGTGCGCG	TCAGCCAGTA	CTGCGCTCCT	CTTTTTCGCT	TTTAGGTTTT	GCTTGCCCTT	14700
TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	14760
TTCTTTCTTT	CTTTCTCTCT	CGCTCTCTCG	CTCTCTCCCT	CGCTCGTTTC	TTTCTTTCTC	14820
TTTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTGTCTCTC	GCTCTCGCCC	TCTCTCTCTC	14880
TTTCTCTCTC	TCTCTGTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	CCTCCCTCCC	14940
TCCCTCTCTC	TCCCTCTCTC	CCCTCTCTTG	GCGCTCTCTC	GGCTCTTGAG	ACTTAGCCGC	15000
TGTCTCGCCG	TGTCCCGGGT	CGACCGGGCG	GCCTTCTCCA	CCGAGCGGCG	TGCCACAGTG	15060
CCCGTCGGGA	CGAGCCGGAC	CCGCGCGCTC	CCGCTCTCGG	TCGGCACCTC	CGGGGTCGAC	15120
CAGCTGCGGC	CCGCGAGCTC	CGGACTTAGC	CGGCGTCTGC	ACGTGTCCCG	GGTCGACCCG	15180
CAGGCGGGCG	CCGGACGCTG	CGGCGCACCG	ACGCGAGGGC	GTGATTCCG	GTTACGCGCG	15240
CGGCGACCTC	CACCGGCCTC	GGCCCGCGGT	GGAGCTGGGA	CCACGCGGAA	CTCCCTCTCC	15300
CACATTTTTT	TCAGCCCCAC	CGCGAGTTTG	CGTCCGCGGG	ACTTTTTAAGA	GGGAGTCACT	15360
GCTGCCGTCA	GCCAGTAATG	CTTCTCTCTT	TTTTGCTTTT	TGGTTTTTGG	TTGCGTTTTT	15420
TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTT	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	15480
TCTCTGTCTC	TCTCTCTCTG	TCTCTCTCTC	CTCCCTCCCT	CCTTGGTGCC	TTCTCGGCTC	15540
GCTGTGCTG	CTGCTCTCTG	CTCCACGGTT	CAAGCAAACA	GCAAGTTTTT	TATTTTCAGT	15600
AAAGACGTAA	TTTCAACATT	TTGGCCGGGC	TGGTCTCGAA	CTCCCGACCT	AGTGATCCGC	15660
CCGCCCTCGG	CTCCCAAAGA	CTGCTGGGAG	TACAGATGTG	AGCCACCATG	CCCGGCGGAT	15720
TCCTTCTTTT	TTTCAATCTT	ATTTTCTGAA	CGTGGCGGTG	TATGAACATA	CATCTACACA	15780
CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACCCC	GTAGTGATAA	15840
AACTATGTAA	ATGATATTTT	CATAATTAAT	ACGTTTATAT	TATGTTACTT	TTAATGGATG	15900

AATATGTATC	GAAGCCCCAT	TTCATTTACA	TACACGTGTA	TGTATATCCT	TCCTCCCTTC	15960
CTTCATTTCAT	TATTTATTAA	TAATTTTCGT	TTATTTATTT	TCCTTTCTTT	TGGGGCCGGC	16020
CCGCCTGGTC	TTCTGTCTCT	GCGCTCTGGT	GACCTCAGCC	TCCCAAATAG	CTGGGACTAC	16080
AGGGATCTCT	TAAGCCCGGG	AGGAGAGGTT	AACGTGGGCT	GTGATCGCAC	ACTTCCACTC	16140
CAGCTTACGT	GGGCTGCGGT	GCGGTGGGGT	GGGTGGGGT	GGGTGGGGT	GCAGAGAAAA	16200
CGATTGATTG	CGATCTCAAT	TGCCCTTTAG	CTTCATTTCAT	ACCCTGTTAT	TTGCTCGTTT	16260
ATTCTCATGG	GTCTTTCTGT	GTCAATTGTCA	CGTTTCATCGT	TTGCTTGCCCT	GCTTGCCCTGT	16320
TTATTTCCCTT	CTTTCCTTCC	TTCCCTTCCTT	CTTTCCTTCC	TTCCCTTCCTT	CCCTCCCTTA	16380
CTGGCAGGGT	CTTCTCTGT	CTCTGCCGCC	CAGGATCACC	CCAACTCAA	CGCTTTGGAC	16440
CGACCAAACG	GTGTTCTGC	CTCTGATCCC	TCCCATCCCC	ATTACCTGAG	ACTACAGGCG	16500
CGCACCACCA	CACCGGCTGA	CTTTTATGTT	GTTTCTCATG	TTTTCCGTAG	GTAGGTATGT	16560
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTATCT	16620
ATGTATGTAC	GTATGTATGT	ATGTATGTGA	GTGAGATGGG	TTTCGGGGTT	CTATCATGTT	16680
GCCACAGCTG	GTCTCGAACT	CCTGTCTCTCA	AGCAATCCGC	CTGCCTGCCT	CGGCCGCCCA	16740
CACTGCTGCT	ATTACAGGCG	TGAGACGCTG	GCGCTGGCTC	CTTCTACATT	TGCCTGCCTG	16800
CTTGCTCATGG	TGCCTGCCTA	TCAATCGTCT	TCCTTTTAGT	ACGGATGTCG	TCTGCTTTTA	16860
TTGTCCATGC	TCTGGGCACA	CGTGGTCTCT	TTTCAAACCT	CTATGATTAT	TATTATTGTA	16920
GGCGTCATCT	CACGTGTCTGA	GGTGATCTCG	AACCTTTAGG	CTCCAGAGAT	CCTCCCGCAT	16980
TGTCGCTCCG	GAGTGCTGTG	ATGACACGCG	TGGGCACGGT	ACGCTCTGGT	CGTGTTTGTC	17040
GTGGGTGCGT	TCCTTCCGTT	TTTAATACGG	GGACTGCGAA	CGAAGAAAAT	TTTCAGACGC	17100
ATCTCACCGA	TCCGCCTTTT	CGTCTTTCT	TTTATTCTC	TTTAGACGGA	GTTTCACTCT	17160
TGTCGCTCCG	GATGGAGTAC	GATGGCGGCT	CTCGGCTCAC	CGCACCCCTC	GCTCCCCAGG	17220
TTCAAGTGAT	TCTCTGCCT	CAGCCTTCCC	GAGTAGCTGG	AATGACAGAG	ATGAGCCATC	17280
GTGCCCCGCT	AATTTTTCTA	TTTTTAGTAC	AGATGGGGTT	TCTCCATCTT	GGTCAGGCTC	17340
GTCTGCAACT	TCCGACCGTT	GGAGAATCTT	AACCTTCTTG	GTGGTGGTTG	TTTTCCTTTT	17400
TCCTTTTTTTT	TCCTTTCTTT	TCCTTCCCTC	TCCTCCCCCC	CCCCCCCCCC	TTGTCGTCTG	17460
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCC	TCCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	17520
CTTTCAGCTG	GGCTCTCTTA	CTTGTGTGTC	TCGTGTGCTC	ACGCTGGTCT	CAAACTCTCT	17580
GCCTTGACTC	TCTCTCCGTC	ACATCCGCCG	TCTGGTGTGT	GAAAATGAGCA	TCTCTCTGTA	17640
AATGGAAAAG	ATGAAAAGAA	TAAACACGAA	GACGGAAAGC	ACGGTGTGAA	CGTTCTCTTT	17700
GCCGTCTCCC	GGGGTGTACC	TTGGACCCGG	AAACACGGAG	GGAGCTTGGC	TGAGTGGGTT	17760
TTCCGTGCGC	AAACCTCCCC	AGGGCCCTCT	TCCCTCTCCC	CCTTGTCCCC	GCTTCTCCGC	17820
CAGCCGAGGC	TCCACCCGCC	GCCCCCTGGC	TTTTCCATAG	GAGAGGTATG	GGAGAGGACT	17880
GACACGCCCT	CCAGATCTAT	ATCCTGCCCG	ACGTCTCTGG	CTCGGCGTGC	CCCCCCGGCT	17940
ACCTGCCACC	TTCACGGGAG	CTCTGAGGCG	GATGCGACCC	CCACCCCCCC	GTACGCTCCC	18000
GCTACCCCTC	CCCGGCTGGC	CTTTGCCGGG	CGACCCACAG	GGAACCGCGT	TGATGCTGCT	18060
TCCGATCCTC	CGGCGAAGAC	TTCCACCGGA	TGCCCCGGGT	GGGCCGGTTG	GGATCAGACT	18120
GGACCACCCC	GGACCGTGCT	GTTCTTGGGG	GTGGGTGAC	GTACAGGGTG	GACTGGCAGC	18180
CCCAGCATTG	TAAAGGGTGC	GTGGGTATGG	AAATGTACAC	TAGGATGCCC	TCCTTCCCTT	18240
CGGTCTGCCT	TCAGCTGCCCT	CAGGCGTGAA	GACAACCTCC	CATCGGAACC	TCTTCTCTTC	18300
CCTTTCTCCA	GCACACAGAT	GAGACGCACG	AGAGGGAGAA	ACAGCTCAAT	AGATACCGCT	18360
GACCTTCATT	TGTGGAATCC	TCAGTCTATC	ACACACAAGA	CAGGTGACTA	GGCAGGGACA	18420
CAGATCAAAAC	ACTATTTCCG	GGTCTCTCTG	GTGGGATTGG	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	18480
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCGCACGC	GCACGCGCGC	ACACACACAC	ACAATTTCCA	18540
TATCTAGTTT	ACAGAGCACA	CTCACTTCCC	CTTTTTCACAG	TACGCAGGCT	GAGTAAAACG	18600
CGCCCCACCC	TCCACCCGTT	GGCTGACGAA	ACCCCTTCTC	TACAATTGAT	GAAAAAGATG	18660
ATCTGGGCGG	GGCAGCTAG	CTCACGCCCT	TCACTCCGGC	ACTTTGGGAG	GCCGAGGCGG	18720
GTGGATCGCT	TGGGGCCGGG	AGTTTCGAGAC	CAGGCTGGCC	GACGTGGCGA	AACCCCGTCT	18780
CTCTGAAAAA	TAGAACGATT	AGCCCGGCCCT	GGTGGCGTGG	GCTTGGAAATC	ACGACCGCTC	18840
GGGAGACTGG	GCGGGGCGAC	TTGTTCCAAC	CGGGGAGGCC	GAGGCCGCGA	TGAGCTGAGA	18900
TGCTGCCGTG	GCGATGCGGC	CTGGATGACG	GAGCGAGACC	CCGTCTCGAG	AGAATCATGA	18960
TGTTATTATA	AGATGAGTTG	TGCGCGGTGA	TGGCCGCTTG	TAGTCGCGGC	TACTCGGGAG	19020
GCTGAGACGA	GGAGAAGATC	ACTTGAGGCC	CCACAGGTCT	AGGCTTCGGT	CGGCCGTGAC	19080
CCACTGTATC	CTGGGCAGTC	ACCGGTCAAG	GAGATATGCC	CCTTCCCGGT	TTGCTTTTCT	19140
TTTCTTCCCT	TCTCTTTTCT	TCTTTTGTCT	TCTCTTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTCTTTTCT	19200
TTCTTTCTTT	CTTCTTTTCT	TTTCTTTTCT	CTCTCTTCCC	CTCTTTCTTT	CCTGCCTTCC	19260
TGCCTTTCTT	CTTCTTCTCT	TCTCTCTCTT	CCTCCCTTCC	TTCTTTCTCT	CCGCTTCAGC	19320
CTCCCAAAGT	GCTGGGATGA	CTGGCGGGAG	GCACCATGCC	TGCTTGGCCC	AAAGAGACCC	19380
TCTTGGAAAAG	TGAGACGCAG	AGAGCGCCCT	CCAGTGATCT	CATTGACTGA	TTTAGAGACG	19440
GCATCTCGCT	CCGTCAACCC	GGCAGTGGTG	CCGTCTGTAAC	TCACTCCCTG	CAGCGTGGAC	19500
GCTCTGGAC	TCGAGCGATC	CTTCCACCTC	AGCCTCCAGA	GTACAGAGCC	TGGGACCGCG	19560

GGCACGCGCC	ACTGTGCCCA	CACCGTTTTT	AATTGTTTTT	TTTTCCCCCG	AGACAGAGTT	19620
TCACTCTCGT	GGCCTAGACT	GCAGTGCGGT	GGCGCGATCT	TGGCTCACC	CAACCTCTGC	19680
CTCCCGGTTT	CAAGCGATT	TCCTGCATCG	GCCTCCTGAG	TAGCCGGGAT	TGCGGGCATG	19740
CGCTGCCACG	TCTGGCTGAT	TTCGTATTTT	TAGTGGAGAC	GGGGCTTCTC	CATGTCGATC	19800
GGGCTGGTTT	CGAACTCCCG	ACCTCAGGTG	ATCCGCCCTC	CCCGGCCTCC	GGAGTGCTG	19860
GGATGACAGG	CGTGAGCCAC	CGCGCCCGGC	CTTCATTTTT	AAATGTTTTT	CCACAGACGG	19920
GGTCTCATCA	TTTCTTTGCA	ACCCCTCTGC	CCGGCGTCTC	AAAGTGCTGG	CGTGACGGGC	19980
GTGAGCCACT	GCGCCTGGAC	TCCGGGGAAT	GACTCACGAC	CACCATCGCT	CTACTGATCC	20040
TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTC	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTC	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTGA	20100
TGAATTATCT	TATGATTTAT	TTGTGTACTT	ATTTTCAGAC	GGAGTCTCGC	TCTGGGCGGG	20160
GCGAGGCGAG	GCGAGGCACA	GCGCATCGCT	TTGGAAGCCG	CGGCAACGCC	TTTCAAAGCC	20220
CCATTTCGTAT	GCACAGAGCC	TTATTCCTCT	CCTGGAGTTG	GAGCTGATGC	CTTCCGTAGC	20280
CTTGGGCTTC	TCTCCATTCC	GAAGCTTGAC	AGGCGCAGGG	CCACCCAGAG	GCTGGCTGCG	20340
GCTGAGGATT	AGGGGGGTGT	TTGGGGCTGA	AAACTGGGTC	CCCTATTTTT	GATACCTCAG	20400
CCGACACATC	CCCCGACCGC	CATCGCTTGC	TGCGCCCTCT	AGATCCCCCG	CCTCCACCCG	20460
CTTGCAGGCT	CACCTCTTAC	TTTCATTCTT	TCCTTTCTTG	CGTTTGAGGA	GGGGTGGCG	20520
GAATGAGGGT	GTGTGTGGGG	AGGGGGTGC	GGGTGGGGAC	GGAGGGGAGC	GTCTTAAGGG	20580
TCGATTTAGT	GTCTATGCCTC	TTTCACCACC	ACCACCACCA	CCGAAGATGA	CAGCAAGGAT	20640
CGGCTAAATA	CCGCGTGTTC	TCATCTAGAA	GTGGGAACCT	ACAGATGACA	GTCTTGCAT	20700
GGGCAGAACG	AGGGGGACCG	GGGACGCGGA	AGTCTGCTTG	AGGGAGGAGG	GGTGGGAAGG	20760
GAGACAGCTT	CAGGAAGAAA	ACAAAACACG	AATACGTCTG	GACACAGCAT	TGACTACCCG	20820
GGTGCAGGCT	TCATCTGCAC	ACTGAACACC	CCCGTCACAA	GTTTACCTAT	GTCAACAATCT	20880
TGCACATGTA	TGCTTGAAC	GACAAATAAA	AGTTAGGGGG	GAGAAGAGAG	GAGAGAGAGA	20940
CAGAGAGAGA	GACAGAGAGA	GACAGAGAGA	GAGAGAGAGG	AGGGAGAGAG	GAAAACGAAA	21000
CACCACTCTC	TTGACCTGAG	TCAGGGGGTT	TCTGGCCCTT	TGGGAGAACG	TTGAGCGACA	21060
ATGCAGTATT	TGGGCCCCGT	CTTTTTTTTT	CTTCTCTTTT	TCTTTCTTTT	TTTTTGGACT	21120
GAGTCTCTCT	CGCTCTGTCA	CCCAGGCTGC	GTCGCGGTG	GCGCTCTCTC	GGTCTACTGA	21180
AACCTCTGCT	TCCCGGGTTC	CAGTGATTCT	TCTTCGGTAG	CTGGGATTAC	AGGCGCACAC	21240
CATGACGGCG	GGCTCATATT	CCTATTTTCA	GTAGAGACGG	GGTTTCTCCA	CGTTGGCCAC	21300
GCTGGTCTCG	AACCTCTGAC	CTCAAATGAT	CCGCTTCTCT	GGGCTTCCCA	AAGTGCTGGA	21360
AACGACAGGC	CTGAGCCGCC	GGGATTTCAG	CCTTTAAAAG	CGCGGCCCTG	CCACCTTTCT	21420
CTGTGGCCCT	TACGCTCAGA	ATGACGTGTC	CTCTCTGCCG	TAGGTTGACT	CCTTGAGTCC	21480
CCTAGGCCAT	TGCACGTGAG	CCTGGGCAGC	AAGAGCCAAA	CTCCGNCCCC	CCACCTCTCT	21540
GCGCACATAA	TAACATACTA	ACAACTAAC	TAACATACTA	AACTAACTAA	CTAACTAAAA	21600
TCTCTACACG	TCACCCATAA	GTGTGTGTTC	CCGTGAGAGT	GATTTCTAAG	AAATGGTACT	21660
GTACAGTGAA	CGCAGTGGCT	CACGTCTGTC	ATCCCGAGGT	CAGGAGTTCC	AGACCAGGCC	21720
GGCCAACGTG	GTGAAACCCC	GTCTCTACTG	AAAATACGAA	ATGGAGTCAG	GCGCCGTGGG	21780
GCAGGCACCT	GTAACCCACG	CTACTCGGGA	GGCTGGGGTG	GAAGAAATGC	TTGAACCTGG	21840
CAGGCGGAGG	CTGCAGTGAC	CCAAGATCGC	ACCACTGCAC	TACAGCTGCG	GCGACAGAGT	21900
GAGACCCGGT	CTCCAGATAA	ATACGTACAT	AAATAAATAC	ACACATACAT	ACATACATAC	21960
ATACATACAT	ACATACATAC	ATCCATGCAT	ACAGATATAC	AAGAAAGAAA	AAAAGAAAAG	22020
AAAAGAAAAG	GAAAATGAAA	GAAAAGGCAC	TGTAATTGCTA	CTGGGCTAGG	GCCTTCTCTC	22080
TGTCTGTTTC	TCTCTGTTCG	TCTCTGTCTT	TCTCTCTGTG	TCTCTTCTCT	TGTCTGTCTG	22140
TCTCTTTCTT	TCTCTCTGTC	TCTGTCTCTG	TCTTTGTCCT	TCTCTCTCCC	TCTCTGCTCT	22200
TCTCACTGTG	TCTGTCTTCT	GTCTTACTCT	CTTTCTCTCC	CCGTCTGTCT	CTCTCTCTCT	22260
CTCTCCCTCC	CTGTTTGTTC	CTCTCTCTCC	CTCCCTGTCT	GTTTCTCTCT	CTCTCTTTCT	22320
GTCTGTTTCT	GTCTCTCTCT	GTCTGTCTAT	GTCTTTCTCT	GTCTGTCTCT	TTCTCTGTCT	22380
GTCTGCTCTT	CTCTTTCTTT	TTCTGTGTCT	CTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CTGTCTGTCT	22440
GTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTGTGCTT	ATCTTCTGTC	TTACTCTCTT	TCTCTGCTCT	22500
TCTGTCTGTC	TCTCCCTCCC	TTTCTGTTTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCCCTCTCTC	22560
CCTGTCTGTT	TCTCTCCGTC	TCTCTCTCTT	TCTGTCTGTT	TCTCACTGTC	TCTCTCTGTC	22620
CATCTCTCTC	TCTCTCTGTC	TGTCTCTTTC	GTTCTCTCTG	TCTGTCTGTC	TCTCTCTCTC	22680
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCCCTGTCTG	TCTGTTTCTC	TCTATCTCTC	GCTGTCCATC	22740
TCTGTCTTTT	TATGTCTGTC	TCTTTCTCTG	TCAGTCTGTC	AGACACCCCC	GTGCCGGGTA	22800
GGGCCCTGCC	CCTTCCACGA	AAAGTGAGAAG	CGCGTGCTTC	GGTGCTTAGA	GAGGCCGAGA	22860
GGAACTCTAGA	CAGGCGGGCC	TTGCTGGGCT	TCCCACTCG	GTGTATGATT	TCCGGAGGTC	22920
GAGGCCGGGT	CCCCGCTTGC	ATGCGAGGGG	CATTTTCTCAG	CTTTTCTCTC	GGTCACGTGT	22980
GGCGTCCGTA	CTTCTCTCTAT	TTCCCCGATA	AGCTCCTCGA	CTTCAACATA	AACGGCGTCC	23040
TAAGGGTTCGA	TTTAGTGTCA	TGCCCTCTTTC	ACCGCCACCA	CCGAAGATGA	AAGCAAAGAT	23100
CGGCTAAATA	CCGCGTGTTC	TCATCTAGAA	GTGGGAACCT	ACAGATGACA	GTTCTTGCAT	23160
GGGCAGAACG	AGGGGGACCG	GGNACGCGGA	AGCCTTGCTT	AGGGGGGAGG	GGYGAAGGA	23220

GAGACAGCTT	CAGGAAGAAA	ACAAAACACG	AATACTGTGG	GACACAGCAC	TGACTACCCG	23280
GGTGATGAAA	TCATCTGCAC	ACTGAACACC	CCCCGCACAA	GTTTACCTAT	GTACAGTCT	23340
TGCTCATGTA	TGCTTGAACG	ACAAATAAAA	GTTCCGGGGG	GAGAAGAGAG	GAGAGAGAGA	23400
GAGAGACGGG	GAGAGAGGGG	GGAGAGGGGG	GGGGAGAGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	23460
AGAGAGAGAG	AGAAAGAGAA	GTAAAACCAA	CCACCACCTC	CTTGACCTGA	GTACAGGGGT	23520
TTCTGGCCTT	TTGGGAGAAC	GTTTCAGCGAC	AATGCAGTAT	TTGGGCCCCG	TCTTTTTTTC	23580
TTCTTCTTCT	TTTCTTTCTT	TTTTTTTGGG	CTGAGTCTCT	CTCGCTCTGT	CACCCAGGCT	23640
GCGGTGCGGT	GCGCTCTCT	CGGCTCACTG	AAACCTCTGC	TTCCCGGGTT	CCAGTGATTC	23700
TTCTTCGGTA	GCTGGGATTA	CAGGTGCGCA	CCATGACGGC	CGGCTCATCG	TTCTATTTT	23760
AGTAGAGACG	GGGTTTCTCC	ACGTTGGCCA	CGCTGGTCTC	GAACCTCTGA	CCACAAATGA	23820
TCCACCTTCC	TGGGCCTCCC	AAAGTGCTGG	AAACGACAGG	CCTGAGCCGC	CGGGATTTEA	23880
GCCTTTAAAA	GCGCGCGGCC	CTGCCACCTT	TGCTGCGGGC	CCTTACGCTC	AGAATGACGT	23940
GTCTCTCTCT	CCATAGGTTG	ACTCCTTGAG	TCCCTTAGGC	CATTGCACTG	TAGCCTGGGC	24000
AGCAAGAGCC	AAACTCCGTC	CCCCCACCTC	CCCGCGCACA	TAAATACTAA	CTAACTAACT	24060
AACATACTAA	AATCTCTACA	CGTCACCCAT	AAGTGTGTGT	TCCCGTGAGG	AGTGATTTCT	24120
AAGAAATGGT	ACTGTACACT	GAACGCAAGC	TTACGCTCTG	TCATCCCGAG	GTACAGAGTT	24180
CGAGACCAGC	CCGGCCACAG	TGGTGAAACC	CCCGTCTCTA	CTGAAAATAC	GAAATGGAGT	24240
CAGGCGCCGT	GGGGCAGGCA	CCTGTAACCC	CAGCTACTCG	GGAGGCTGGG	GTGGAAGAA	24300
TGCTTGAACC	TGGCAGGCGG	AGGCTGCAGT	GACCCAAAGAT	CGCACCACTG	CACATACAGC	24360
TGGGCGACAG	AGTGAGACCC	GGTCTCCAGA	TAAATACGTA	CATAAATAAA	TACACACATA	24420
CATACATACA	TACATACAAC	ATACATACAT	ACAGATATAC	AAGAAAGAAA	AAAAGAAAAG	24480
AAAAGAAAAG	GAAAAAGGAC	GAAAAAGGAC	TGTATTGCTA	CTGGGCTAGG	GCCTTCTCTC	24540
TGTCTGTTTC	TCTCTGTTCT	TCTCTGTCTT	TCTCTGTGTG	TCTCTTCTCT	TGTCTGTCTG	24600
TCTGTCTGTC	TGTCTGTCTC	TTCTTTCTCT	TCTGTCTCTG	TCTTTGTCCC	TCTCTCTCCC	24660
TCTCTGCCCT	GTCTCACTGT	GTCTGTCTCT	TATCTTACTC	TCTTTCTCTC	CCCGTCTGTC	24720
TCTCTCTCAC	TCCCTCCCTG	TCTGTTTCTC	TCTCTCTCTC	TTTCTGTCTG	TTTCTGTCTC	24780
TCTCTGTCTG	CCTCTCTCTT	TCTCTATCTG	TCTCTTCTCT	TGTCTGTCTG	CCCTCTCTCT	24840
TCTTTTCTCT	TGTCTCTCTG	TCTGTCTCTC	TCTCTCTCTG	TGCCATCTCT	CTGTCTTACT	24900
CTCTTTCTCT	GCCTGTCTGT	CTGTCTCTCT	CTGTCTCTCC	CTCCCTTTCT	GCCTCTCTCT	24960
CTCTCTCTCT	CTCTNNNCCC	TCCCTGTCTG	TTTCTCTCTG	TCTCCCTCTC	TTTCTGTCTG	25020
TTTCTCACTG	TCTCTCTCTG	TCTGTCTGTT	TCATTCTCTC	TGTCTCTGTC	TCTGTCTCTC	25080
TCTCTCTCTG	TCTCTCCCTC	TCTGTGTGTA	TCTTTTGTCT	TACTCTCTCT	CTCTGCCTGT	25140
CCGTCTGTCT	GTCTGTCTCT	CTCTCTCCCT	CTCTCTCTCT	CTTTCTGTCT	GTTTCTCTCT	25200
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTGTCTCTGT	CTTTCTCTGT	CTGTCCCTTT	CTCTGTCTGT	25260
CTCCCTCTCT	CTTTCTCTTT	CTGTGTCTCT	CTGTCTCTCT	CTCTGTGCCT	ATCTTCTGTC	25320
TTACTCTCTT	TCTCTGCCCT	TCTATCTGTC	TGTCTCTCTC	TGTCTCTCTC	CCTGCCCTTC	25380
TGTCTCTCTC	TCTCTCCCTC	TCTCGCTCTC	TCTGTCTTTC	TCTCTTTCTC	TCTGTTTCTC	25440
TGTCTCTCTC	TGTCCGTCTC	TGTCTTTTTC	TGTCTGTCTG	TCTCTCTCTT	TCTTTCTGTC	25500
GTCTGTCTCT	GTCTGTCTCT	CTGTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCCTTGTCT	CTCTCACTGT	25560
GTCTGTCTCT	TGTCTTACTC	TGCTTCTCTG	CCTGTCCATC	TGTCTGTCTG	TCTCTCTCTC	25620
TCTCTCCCTA	CTTTCTCTGT	TCTCTCTCGC	TAGCTCTCTC	TCTCTCTGCC	TGTTTCTCTC	25680
TTTCTCTCTC	TGTCTTTCTC	TGTCTGTCTC	TTTCTCTGTC	TGTCTGTCTC	TTTCTCTCTG	25740
TCTCTGTCTC	TGTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TGCCCTCTCT	ACTGTGTCTG	25800
TCTTTCTGTCT	TATTCTCTTT	CTCTCTCTGT	CTCTCTCTCT	CTCTCCCTTA	CTGTCTGTTT	25860
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTTT	CTGCCGTGTT	CTCTCTGTCT	GTCTCTGTCT	TTCTCTGTCT	25920
GTCTGCCCTCT	CTCTTTCTTT	TTCTGCGTCT	CTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTGTTCCT	25980
ATCTTCTGTC	TTACTCTGTT	TCCCTGCCCT	CCTGCCCTGTC	TGTGTGTCTG	TCTCTCTCTC	26040
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCCC	TCCCTTTCTC	TTTCTCTGTC	TCTCTCTCTC	TTTCTGGGTG	26100
TTTCTCTCTG	TCTCTCTGTC	CATCTCTGTC	TTTCTATGTC	TGTCTCTCTC	TTTCTCTCTG	26160
TCTCTGTCTC	TGCCCTCTCT	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTGTCTGTC	TCTCTCACTG	26220
TGTGTGTCTG	TCTTCTGTC	TACTCTCTCT	CTCTGCCCTG	CCGTCTGTCT	GTCTGTCTCT	26280
CCCTCTCTCT	CCCTCCCTTT	CTGTCTCTCT	CTCTCTCTCT	TTCTGTCTGT	TTCTCTCTTT	26340
CTCTCTCTGT	CTGTCTCTTT	CTCTGTCTGT	CTGTCTCTCT	CTTTCTTTT	CTCTGTCTCT	26400
CTGTCTCTCT	CTGTGTCTGT	CTCTCTGTCT	GTGCCATCTC	TCTGTCTTAC	TCTCTTTCTC	26460
TGGCTGTCTG	CCTGTCTCTC	TCTCTCTCTC	TGTCTGTCTC	CGTCCCTCTC	TCCCTGTCTG	26520
TCTGTTTCTC	TCTCTGCCCT	TCTCTCTCTC	TGTCTGTCTC	TTTCTCTGTC	TGTCTGTCTC	26580
TCTCTTTCTT	TTTCTCTGTC	TCTCTGTCTC	TCTCTGTCTC	TGTCTCTCTT	TCTGTGCCCTA	26640
TCTTCTGTCT	TACTCTCTTT	CTCTGGCTGT	CTGCCCTGTC	CTCTCTCTCT	GCCTGTCTCC	26700
GTCCCTCCCT	CCCTGTCTGT	CTGTTTCTCT	CTGTCTCTCT	GTCTCTCTGT	CCATCTCTGT	26760
CTGTCTCTTT	CTCTTTCTCT	CTCTCTGTCT	CTGTCTCTCT	CTCTCTCTGC	CTGTCTCTCT	26820
CACGTGTCTT	GTCTTCTGTC	TTACTCTCTT	TCTCTTGCCT	GCCTCTCTGT	CTGTCTGTCT	26880

CTCTCCCTCC	ATGTCTCTCT	CTCTCTCTCA	CTCACTCTCT	CTCCGTCTCT	CTCTCTTTCT	26940
GTCTGTTTCT	CTCTCTGTCT	GTCTCTCTCC	CTCCATGTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCACTCA	27000
CTCTCTCTCC	GTCTCTCTCT	CTCTTTCTGT	CTGTTTCTCT	CTCTGTCTGT	CTCTCTCCCT	27060
CCATGTCTCT	CTCTCTCCCT	CTCACTCACT	CTCTCTCCGT	CTCTCTCTCT	CTTTCTGTCT	27120
GTTTCTTTGT	CTGTCTGTCT	GTCTGTCTGT	CTGTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	27180
CTCTCTGTTT	GTCTTTCTCC	CTCCCTGTCT	GTCTGTCTGT	CTCTCTCTCT	CTGTCTCTGT	27240
CTCTGTCTCT	CTCTCTTTCT	CTTTCTGTCT	GTTTCTCTCT	ATCTCTCGCT	GTCCATCTCT	27300
GTCTTTCTAT	GTCTGTCTCT	TTCTCTGTCA	GTCTGTCTCA	CACACCCGTG	CCGGTAGGGC	27360
CCTGCCCTTC	CACGAGAGTG	AGAAGCGCGT	GC'TTCCGTGC	TTAGAGAGGC	CGAGAGGAAT	27420
CTAGACAGGC	GGGCTTTGCT	GGGCTTCCCC	ACTCGGTGTA	CGA'TTTCGGG	AGGTGAGGGC	27480
CGGGTCCCCG	CTTGGATGCG	AGGGGCATTT	TCAGACITTT	CTCTCGGTCA	CGTGTGGCGT	27540
CCGTACTTCT	CCTATTTCCC	CGATAAGTCT	CCTCGACTTC	AACATAAACT	GTTAAGGGCG	27600
GACGCCAACA	CGGCGAAACC	CCGTCTCTAC	TAAAAATACA	AAGCTGAGTC	GGGAGCGGTG	27660
GGGCAGGCCC	TGTAATGCCA	GCTCCTCGGG	AGGCTGAGGC	GGGAGAATCG	CTTGAACCAG	27720
GGAAGCGGAG	GCTGCAGGGA	GCCGAGATCG	CGCCACTGCA	CTACGGCCCA	GGCTGTAGAG	27780
TGAGTGAGAC	TCGGTCTCTA	AATAAATACG	GAAATTAATT	AATTCATTAA	TTCTTTTCCC	27840
TGCTGACGGA	CATTTGCAGG	CAGGCATCGG	TTGTCTTCGG	GCATCACCTA	GCGGCCACTG	27900
TTATTGAAAG	TCGACGTTGA	CACGGAGGGA	GGTCTCGCCG	ACTTCACCGA	GCCTGGGGCA	27960
ACGGGTTTCT	CTCTCTCCCT	TCTGGAGGCC	CCTCCCTCTC	TCCCTCGTTG	CCTAGGGAAC	28020
CTCGCCTAGG	GAACCTCCGC	CCTGGGGGCC	CTATTGTCTT	TTGATCGGCG	CTTTACTTTT	28080
CTTTGTGTTT	TGGCGCCTAG	ACTCTTCTAC	TTGGGCTTTG	GGAAGGGTCA	GTTTAATTTT	28140
CAAGTTGCCC	CCCGGCTCCC	CCCACTACCC	ACGTCCCTTC	ACCTTAATTT	AGTGAGNCGG	28200
TTAGGTGGGT	TTCCCCCAAA	CCGCCCCCCC	CCCCCGCCT	CCCAACACCC	TGCTTGGAAA	28260
CCTTCCAGAG	CCACCCCGGT	GTGCCTCCGT	CTTCTCTCCC	CTTCCCCCAC	CCCTTGCCGG	28320
CGATCTGACT	CTTGCCAGGC	TGACATTTGC	ATCGGTGGGC	GTCAGGCCTC	ACTCGGGGGC	28380
CACCGTTTTT	GAAGATGGGG	GCGGCACGGT	CCCACTTCCC	CGGAGGCAGC	TTGGGCCGAT	28440
GGCATAGCCC	CTTGACCCGC	GTGGGCAAGC	GGGCGGGTCT	GCAGTTGTGA	GGCTTTTCCC	28500
CCCGCTGCTT	CCCGCTCAGG	CCTCCCTCCC	TAGGAAAGCT	TCACCCCTGG	TGGGTCTCGG	28560
TCACCTTTTA	TCACGATGTT	TTAGTTTCTC	CGCCCTCCGG	CCAGCAGAGT	TTCACTATGC	28620
GAAGGGCCGC	ACGGCTCTAG	TCTGGGCCTT	CTCAGTACTT	GCCCCAAATA	GAAACGCTTT	28680
CTGAAAACCTA	ATAACTTTNC	TCACCTAAGA	TTTCCAGGGA	CGGCGCCTTG	GCCCCGTGTT	28740
GTTGGCTTGT	TTTGT'TTCGT	TCTGTTTTGT	TTTGTTCGTG	TTT'TTCCCTT	CTCGTATGTC	28800
TTTCTTTTCA	GGTGAAGTAG	AAATCCCCAG	TTTTCAGGAA	GACGTCTATT	TTCCCCAAGA	28860
CACGTTAGCT	GCCGTTTTTT	CCTGTTGTGA	ATTAGCGCTT	TTGTGACTCT	CTCAACGCTG	28920
CAGTGAGAGC	CGGTTGATGT	TTACNATCCT	TCATCATGAC	ATCTTATTTT	CTAGAAATCC	28980
GTAGGCGAAT	GCTGCTGCTG	CTCTTGTTGC	TGTTGTTGTT	GTTGTTGTTG	TCGTGATGTC	29040
TGTTGTCGTT	GTCGTTGTTG	TTGTCGTTGT	CGTTGTTTTC	AAAGTATACC	CCGGCCACCG	29100
TTTATGGGAT	CAAAAGCATT	ATAAAATATG	TGTTGATTATT	TCTTGAGCAC	GCCCTTCCCT	29160
CCCTCTCTCT	TGTTCTCTCT	TCTGTCTCTG	TCTCTCTCTT	TCTCTGTCTG	TCTTCTCTCT	29220
CTCTCTCTCT	CTGTGTCTCT	CTCTCTCTGC	CTGTCTGTTT	CTCTCTCTCT	GCCTCTCTCT	29280
CTCTCTCTCT	CTCTGCCTGT	CTCTCTCACT	GTGTCTGTCT	TCTGTCTTAC	TCCCTTTCTC	29340
TGTTCTGTCT	TCGGTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCCCTGTCTG	TATGTTTCTC	TCTGTCTCTG	29400
TCTCTCTCTC	TCTTTCTGTT	TCTCTCTCTC	CGTCTCTGTC	TTTCTCTGAC	TGTCTCTCTC	29460
TTTCTTTCTC	TCTGTCTCTC	TCTGCCTGTC	TCTCTCACTC	TGTCTTCTGT	CTTATCTCTC	29520
TCTCTGCCTG	CCTGTCTCTC	TCACCTCTCT	TCTCTGTGTG	TCTCTCTCTC	TCTTCTGTGT	29580
TCTCTCTGTC	TCTCTGTCCG	TCTCTGTCTT	TCTCTGTCTG	TCTCTTGTCT	TGTCTGTCTT	29640
TGTTCTTCTT	TCTCTCTGTC	TCTGTCTCTC	TCACGTGTCT	TGTTCTTCTGT	CTTAGTCTCT	29700
CTCTCTCTCT	CTCCCTGTCT	GTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CCCCCTGTCT	GTTTCTCTCT	29760
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTGTCTTT	GTCTTTCTTT	CTGTCTCTGT	CTCTCTCTCT	29820
CTCTCTGTGT	GTCGTCTTTC	TGTCCTTACT	TCTTTCTCTG	CCTGTCTGTC	TGTCTGTCTC	29880
TCTCTGTCTG	TCTCTCTCTC	TCTCTCCCCC	TGTCGGCTGT	TTCTCTGTCT	CTGTCTGTGT	29940
CTCTCTTTCT	GTCTGTCTCT	CTCTGTCTGT	CTTTCTCTCT	CTGTCTCTTT	CTCTCTGTCT	30000
CTCTGTCTGT	CTCTGTCTCT	CTCTCTGTCT	CTCTCTCTCT	GTGGGGGTGT	GTGTGTGTGT	30060
GTGTATGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	CTGCCITCTG	TCTTACTCTC	TTTCTCTGCC	30120
TGTTCTGTCT	CCTGTCTGTT	TGTCTCTCTC	TCTCTGCCCT	TCTCTCTCCC	TTCTGTCTGT	30180
TTTCTCTCTC	TTTCTGTTTC	TCTCTGTCTC	TGTCCATCTC	TGTCTTTCTC	CGTCTGTCTC	30240
TTTATCTGTC	TCTCTCCGTC	TGTCTCTTTA	TCTGTCTCTC	TCTCTCTTTC	TGTCTTTCTC	30300
TCTCTGTGTA	TCGTTGTCTC	TCTCTGTCTG	TCTCTGTCTC	TGTCTCTCTG	TCTCTCTCTC	30360
TCTCTCTCTC	TCTCTGTCTG	TCTGTCCGTC	TGTCTGTCTC	GGTCTCTGCG	TCTCGCTATC	30420
TCCCGCCCTC	TCTTTTTTTG	CAAAAGAAGC	TCAAGTACAT	CTAATCTAAT	CCCTTACCAA	30480
GGCCTGAATT	CTTCACTTCT	GACATCCCAG	ATTGTATCTC	CCTACAGAAAT	GCTGTACAGA	30540

ACTGGCGAGT	TGATTTCTGG	ACTTGGATAC	CTCATAGAAA	CTACATATGA	ATAAAGATCC	30600
AATCCTAAAA	TCTGGGGTGG	CTTCTCCCTC	GACTGTCTCG	AAAAATCGTA	CCTCTGTTCC	30660
CCTAGGATGC	CGGAAGAGTT	TTCTCAATGT	GCATCTGCCC	GTGTCTTAAG	TGATCTGTGA	30720
CCGAGCCCTG	TCCGTCTGTG	CTCAAAATATG	TACGTGCAAA	CACCTCTCTC	CATTTCCACA	30780
ACTACCCACG	GCCCTTGTG	GAACCACTGG	CTCTTTGAAA	AAAAATCCAG	AACTGGTTTT	30840
GGCTTTTTGG	CTAGGAGGCC	TAAGCCTGCT	GAGAACTTTC	CTGCCCAGGA	TCCTCGGGAC	30900
CATGCTTGCT	AGCGCTGGAT	GAGTCTCTGG	AAGGACGCAC	GGGACTCCGC	AAAGCTGACC	30960
TGTCCACCCG	AGGTCAAATG	GATACCTCTG	CATTGGCCCG	AGGCCTCCGA	AGTACATCAC	31020
CGTCACCAAC	CGTCACCGTC	AGCATCCTTG	TGAGCCTGCC	CAAGGCCCCG	CCTCCGGGGA	31080
GACTCTTGGG	AGCCCCGGCT	TCGTCCGGCTA	AAGTCCAAAG	GGATGGTGAC	TTCCACCCAC	31140
AAGGTCCAC	TGAACGGCGA	AGATGTGGAG	CGTAGGTACG	AGAGGGGACC	AGGAGGGGAG	31200
ACGTCCCGAC	AGGCGACGAG	TTCCCAAGGC	TCTGGCCACC	CCACCCACGC	CCCACGCCCC	31260
ACGTCCCGGG	CACCCGCGGG	ACACCGCCGC	TTTATCCCTT	CCTCTGTCCA	CAGCCGGCCC	31320
CACCCACCA	CGCAACCCAC	GCACACACGC	TGGAGGTTCC	AAAACCAAC	GGTGTGACTA	31380
GAGCCTGACG	GAGCGAGAGC	CCATTTACAG	AGGTGGGAGG	GGTGGGGGTG	GGGTGGGTTG	31440
GGGGTTGTGG	GGTCTGTGGC	GAGCCCGATT	CTCCCTCTTG	GGTGGCTACA	GGCTAGAAAT	31500
GAATATCGCT	TCTTGGGGGG	AGGGGCTTCC	TTAGGCCATC	ACCGCTTGCG	GGACTACCTC	31560
TCAAACCCCTC	CCTTGAGGCC	ACAAAATAGA	TTCCACCCCA	CCCATCGACG	TTTCCCCCGG	31620
GTGCTGGATG	TATCCTGTCA	AGAGACCTGA	GCCTGACACC	GTCGAATTAA	ACACCTTGAC	31680
TGGGTTTGTG	TGTTTGTITG	TTTCTGAGAT	GGAGTCTTGC	TCTGTCCCCC	AGGCTGGAGT	31740
GCAGTGGCGT	GATCTCAGCT	CAGTGGAAAC	TCTGCCTCCT	GGGTTCAGAT	GATTCTCCTG	31800
CTCAGCGGCC	ACCATGGCCG	GCTCATTTTT	TTTTTTTITT	TTTTTGGTAG	ACACGGGGTT	31860
TCACCCCTCTT	TCATTGGTTT	TCAGTGGAGA	TTCTAGATTC	GAGCCACACC	TCATTCCGTG	31920
CCACAGAGAG	ACTTCTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTAAGCG	CAACGCAACA	TGCTGCTCTT	31980
ATTTGAGTGG	CTTCTATAT	CATTATAATT	GTGTTATAGA	TGAAGAAACG	GTATTAAACA	32040
CTGTGCTAAT	GATAGTGAAT	GTGAAGACAA	AAGAAAGGCT	ATCTATTTTG	TGGTTAGAAT	32100
AAAGTTGCTC	AGTATTTAGA	AGCTACCTAA	ATACGTCAGC	ATTTTACACTC	TTCTTAGTAA	32160
AAGCTGGCCG	ATCTGAATAA	TCTCCTTTTA	AACAAACACA	ATTTTTCATA	GGGTTAAGAT	32220
TTTTTTAAGA	ATGCGACTCC	TGCAAAATAG	CTGAACAGAC	GATACACATT	TAAAXAAATA	32280
ACAACACAAG	GATCAACCAG	ACTTGGGAAA	AAATCGAAAA	CCACACAAGT	CTTATGAAGA	32340
ACTGAGTTCT	TAAAAATAGGA	CGGAGAACGT	AGCTATCGGA	AGAGAAGGCA	GTATTGGCAA	32400
GTTGATTGTT	ACGTTGGTCA	GCAGTAGCTG	GCACATCTTT	TTTGGCCATC	TTTCCGGGCA	32460
TGTAACCTACT	ACAGCAAAAT	GAGATATGAT	CCATTAAACA	ACAATATTCGC	AAATCAAAAA	32520
GTGTTTCAGT	AATATAATGC	TTTCAATTTA	GAAGCAAAATC	AAATGATAGA	ACTCCACTGC	32580
TGTAATAAGT	CACCCCAAAG	ATCACCGTAT	CTGACAAAAT	AACTACCACA	GGGTTATGAC	32640
TTTCAAGTCA	TACTTTCTTC	TTGATATTTA	CTTATGTATT	TATTTTTTTT	AAITTTATTC	32700
TCTTGAGACG	CGTCTCGCTC	TGTCGCCCCAG	GCTGGAGTGC	GATGGTGTGA	TCTCGGCTCA	32760
CTGCAACCCG	CACCTCCCTG	GGTTCAAGCG	ATTCTCCTGC	CTCAGCCTCC	CGAGTAGCTG	32820
GGACTACAGG	TGCCCCCCAC	CACGCCACGC	TAATCTTTAT	ACTTTTAATA	GACACGGGGT	32880
TTTACCGTGT	CGGCCCGGAT	GGTCTCGATC	TCTTGACCTC	GTGACCCGCC	CGCCTCGGCC	32940
TCCCAAAGTG	CTGGGATGAC	AGGCGTGAGC	CAGTGAAGCC	GGCCTTCTCT	TGACGTTTAA	33000
ACTATGAAGT	CAGTCCAGAG	AAACGCAATA	AATGTCAACG	GTGAGGATGG	TGTTGAGGCA	33060
GAAGTAGGAC	CACACTTTTT	CCTATCTTAT	TCAGTTGATA	ACAATATGAC	CTAGGTAGTA	33120
ATTTCCCTATG	TGCCTACTTA	TACACGAGTA	CAAAAGAGTA	AAACAGAGAG	ACTGCTAAAT	33180
TAAAGGGTAC	GTGAAGTTCT	TCATAGTAAC	TCCGTAAACT	GGAACACTGT	CAAAAAGCAG	33240
CAGCTAGTGA	ATTGTTTCCA	TGTATTTTTC	TATTATCCAA	TAAGTGAAC	ATGCTATTCC	33300
TTTCCAGTCT	CCCAAGCACT	TCTTGTCCCC	ATCACCACTT	CGGTGCTCGA	AGAAAAAGTA	33360
AGCAAATCAA	GGAAACACAAG	CTAAAGAAAC	ACACACACAA	ACCAAAGACA	ACTACAGCGT	33420
CTGCAAAAGT	TTGCTAGAAAG	ACTGAAACTG	TTGAGTATAA	GGATCTGGTA	TTCTACGATC	33480
ATGAGTTTAC	TTTCAAGTTT	GTTCAAGACA	TACGTTTTCG	AAGGAAACAT	CTTAGTTAGA	33540
AGTTATTTCAG	CAGTAGGTAC	CATCCCTAAG	TATTTTTTAC	CAATCCGTG	ACAATAAAGA	33600
GCTATCTAAC	CAGAAAAATT	AGCGAGTACG	GGCACCATCC	ATAGGGCTTT	GTCTTTACGC	33660
TTTATTAGCA	CTTACCATGC	CTTCAAAATG	CTAGGATTGA	CCCTGATAGC	ATTTCAAAAA	33720
CAAGCTAATC	CTTTGTCCAG	TTCTTTCAGT	AAGCAAACTC	ACGCCCTAAT	GCGCTATAGG	33780
CATAAGCATC	ATTTGGATCC	ACTTCGAGAG	TTCTCTGGAA	GAATTGAATC	GCAATATCGT	33840
GTTCCTGTTT	GCAGACCGAA	ACAGTTTCCC	TGACGCACAC	CAGGCCTCTG	GCTGGCGAAT	33900
TTTTATCCAT	GTCTGTGAAG	TCTTTGGACA	GAAGTGAAG	AGCAACCTCT	TTTGGAGGAT	33960
GCCAAAGTGT	TGTAGAGTAG	ATCTCCATGC	CTTCGACTCT	GTAAATCTCA	ATCTCTCTAA	34020
CCTCTGAGAA	TTGTCTTTCA	GCTTGGCTGG	ACTCTGAAAG	TTTACAATAG	GCCNTTTCCG	34080
ATTTGGCACA	GTACCCAACC	GGTATTGCAG	TGGTGAGAAG	CTAGATGGCT	CAAGATGCTG	34140
ATAGCTTCTT	TGCCGTGGTA	AGAACACAAA	GCTAAATAAC	CTTTCCCCCT	TTTACGAAGA	34200

AGGCTCATCA	AGCCTTCCGC	TGCTGCTTTT	TGTAGATTAA	AAGCCTGAAT	CTGAGGCGCG	34260
ATTGCGGCTA	TTTTCCTTC	TGAAATGACG	GAAGAGTCCA	ATTTTGTAC	TTCCAGGCTA	34320
TCACCTATGT	TCGGTGGAGT	TATTGCTCCT	TTATTAGTTT	TACTTTTGGT	TCTTCTGTTT	34380
GGGATTTTAG	GTGGAAACTT	CATTTTTAAT	TTTCTCCTAA	TTCTCCTCGG	TTGTGGAGCT	34440
GTCACTAGTC	AAGAGTCGTG	AATTTCTTCG	AGGNCGGTGC	ATTTGGGGGA	GATGCCATAG	34500
TGGGGCTCAA	TACCTGAGGT	GTGCCCCTTG	TCGGCGGACC	AGAACTTTGT	GTTTTTGCAA	34560
GGACTGGAGT	TACCTTTCCG	CTCTTTCCCC	TCTGCGAGAA	GACAGACGGT	GTTCCGGTTT	34620
GGCCGATTCT	GGCAACAGGC	TTTTCTGAAG	GGGCTCCGGT	GGATGGCACG	TCAGTGACAG	34680
ACGGTGTCTC	ATACCACTGC	AGTTTTGTCA	ATAGGGTCCG	TCTCCGGGAC	TTGGGGTTTC	34740
TAATGGCAAA	ATGCCAACAC	TTGGGGTTAA	TGGACTAACA	GCTGCTGGTC	CTCCTAATAA	34800
ACTTCGACCA	GTTTTTGGTT	TATGTTGAAC	CTGTTTAGAT	CATATGGAAG	TTCTGTTC	34860
CAGTGGGACA	GTATCAGGTG	AAAGGACAGC	TGAATCGATA	GAAGACACTG	GGGAGTCTGT	34920
ATTCAAGGAG	TACTTTGAAT	TGGAAGATT	TAAATTCCAT	CCGTTTCATT	CGACGGTGT	34980
CTGGGGTGTT	TCCGTAAGAA	CGGTCTCGGG	CTGTCTGTGA	CATAAACTAG	GACGAGGTCC	35040
AAGTGTGTGT	GCGCAACACT	TGGACAGGCA	GTGCTAAAG	CTCTCTAGAG	AGGTGAATCA	35100
AAATGTTTGG	TACGGATCTG	GCTTTTCCCC	CTTATTTTAC	ATCATGATT	AAAGGGACAC	35160
CAGAGGAAAG	GATTTCAACG	AAGGCTCTTT	TGGTCAATT	CTGATCCTTT	GGTAAGCCGA	35220
TCTGTCTTGC	AATATACATG	TCCCGACGAT	GGAAGGGGAA	AGCGAGCTGA	ATCACCAAA	35280
TCAGGAACGA	TAATATCATC	GTGGCTTTTC	TGCTTATGAA	ACACTCCACC	CGATAAGATT	35340
TGATCCCCCT	CTGCAAGCTT	GCTGAGATCA	ACACACATT	TCGCAAGCAG	GCATTTGCAT	35400
TGCGGGGTAG	TACAACTGTG	TCCTTTCAAG	AGTCTATATG	TTTTATAGGC	CTTTCCTGAG	35460
CGSTAAGAAC	AGGTGCGCAG	TAAGAACAAG	GCTTCTCTG	AGTGTACTTC	TGCATAAAGG	35520
CGTTCTGCGG	GGGAAACCGC	ATCTCGGTAG	GCATAGTGGT	TTAGTGCTTG	CCATATAGCA	35580
GCCTGGACGG	GTCCCTGACG	CACCGCCATC	CTCGAGGCTC	AGGCCCACTT	TCTGCACTGC	35640
CACAGGCACC	CCCCCCCCC	CATAGCGGCT	CCGGCCCCGG	CAGCCCCGGC	TCATTTAAAG	35700
GCACCGCCG	CCGTTACCGG	GGGATGGGGG	AGTCCGAGAC	AGAAAGACTT	CTTTATCCTG	35760
CTGACTCTGG	AAAGCCCCGG	GCCTTGTGAT	CCATTGCAAA	CCGAGAGTCA	CTCGTGTGTT	35820
AGAACACGGA	TCCACTCCCA	AGTTCACTGG	GGGGATGTGA	GGGGTGTGGC	AGGTAGGACG	35880
AAGGACTCTC	TTCTTCTGTA	TTCCGGTCTG	ACAGTGGGGC	CTAGGGCTGG	AGCTCTCTCC	35940
GTGCGGACCG	CTGACTCCCT	CTACCTTGGG	TTCCCTCGGC	CCCACCCTGG	AACGCCGGGC	36000
CTTGGCAGAT	TCTGGCCCTT	TCTGGCCCTT	CAGTCGCTGT	CAGAAACCCC	ATCTCATGCT	36060
CGGATGCCCC	GAGTGACTGT	GGCTCGCACC	TCTCCGAAAA	CATTGGAAAT	CTCTCCTCTA	36120
CGCGCGGCCA	CCTGAAACCA	CAGGAGCTCG	GGACACACGT	GCTTTCGGGA	GAGAATGCTG	36180
AGAGTCTCTC	GCCGACTCTC	TCTTGACTTG	AGTTCCTTCG	GGGTGCGTGG	TTAAGACGTA	36240
GTGAGACCAG	ATGTATTAAC	TCAGGCCGGG	TGCTGGTGGC	TCACGCCTGT	AACCCCAACA	36300
CTTTGGGAGG	CCGAGGCCGT	AGGATCCCTC	GAGGAATCGC	CTAACCCCTG	GGAGGTTGAG	36360
GTTGCAGTGA	GIGAGCCATA	GTGTGTCTAC	TGTGCTCCAG	TCTGGGCGAA	AGACAGAATG	36420
AGGCCCTGCC	ACAGGCAGGC	AGGCAGGCAG	GCAGGCAGAA	AGACAACAGC	TGTATTATGT	36480
TCTTCTCAGG	GTAGGAAGCA	AAAATACAG	AATACAGCAC	TTAATTAATT	TTTTTTTTTT	36540
CCTTCGGACG	GAGTTTCACT	CTTGGTGCCC	ACGCTGGAGT	GCAGTGGCAC	CATCTCGGCT	36600
CACCGCAACC	TCCACCTCCC	GCGTTCAAGC	GATTCTCCTG	CCTCAGCCTC	CTGAGTAGCT	36660
GGGATTACAG	GGAGGAGCCA	CCACACCCAG	CTGATTTTGT	ATTGTTAGTA	GAGACGGCAT	36720
TTCTCCATGT	GGGTCAAGCT	GGTCTCGAAC	TGGCGACCCC	AGTGGATCTG	CCCGCCCCGG	36780
CCTCCCAAAG	TGCTGGGGTG	ACAGGCGTGA	GCCATCGTGA	CTGGCCGGCT	ACGTTTATTT	36840
ATTTATTTTT	TTAATTATTT	TACTTTTTTT	TAGTTTTCCA	TTTAAATCTA	TTTATTTATT	36900
TACATTTATT	TATTTATTTA	TTTATTTACT	TATTTATTTA	TTTTTCGAGAC	AGACTCTCGC	36960
TCTGTGCCCC	AGGCTGGAGT	GCAGCGGCGT	GATCTCGGCT	CACITGCAACG	TCCGCCCTCC	37020
GGGTTACAGC	CATTCTCCTG	CCTCAGCCTC	CCAAGTAGCT	GGGACTACAG	GCGCCCCCCA	37080
CCGTGCCCCG	CTAACTTTTT	GTATTTTGAG	TAGAGATGGG	GTTTCACTGT	GGTAGCCGAG	37140
ATGGTCTCGA	TCTCCTGACC	CCGTGATCCG	TACACCTCGG	CCTCCCAAAG	TGCTGGGATG	37200
ACAGGCGTGA	GCCACCGGCC	CCGGCCTATT	TATCTATTTA	TTAACTTTGA	GTCCAGGTTA	37260
TGAAACCAGT	TAGTTTTTGT	AATTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTGAGA	CGAGGTTTCA	37320
CCGTGTGCCC	AAGGCTTGGA	CCGAGGGATC	CACCGGCCCT	CGGCCTCCCA	AAAGTGCGGG	37380
GATGACAGGC	GCGAGCCTAC	CGCGCCCCGA	CCCCCCTTTT	CCCCCTCCCC	CGCTTGTCTT	37440
CCCCACAGAC	AGTTTCACGG	CAGAGCGTTT	GGCTGGCGTG	CTTAAACTCA	TTCTAAATAG	37500
AAATTTGGGA	CGTCAGCTTC	TGGCCTCACG	GACTCTGAGC	CGAGGAGTCC	CCTGGTCTGT	37560
CTATCACAGG	ACCGTACACG	TAAGGAGGAG	AAAAATCGTA	ACGTTCAAAG	TCAGTCATTT	37620
TGTGATACAG	AAATACACGG	ATTACCCCAA	AACACAGAAA	CCAGTCTTTT	AGAAATGGCC	37680
TTAGCCCTGG	TGTCGGTGCC	AGTGATTCTT	TTCCGGTTTG	ACCTTGACTG	AGAGGATTCC	37740
CAGTCGGTCT	CTCGTCTCTG	GACGGAAGTT	CCAGATGATC	CGATGGGTGG	GGGACTTAGG	37800
CTGCGTCCCC	CCAGGAGCCC	TGGTGCATTA	GTTGTGGGGA	TCGCCTTGGG	GGGCGCGGTG	37860

ACCCACTGTG	CTGTGGGAGC	CTCCATCCTT	CCCCCACC	CCTCCCCAGG	GGGATCCCCA	37920
TTCATTCCGG	GCTGACACGC	TCACTGGCAG	GCGTCGGGCA	TCACCTAGCG	GTCAGTGTTA	37980
CTCTGAAAAC	GGAGGCCCTCA	CAGAGGAAGG	GAGCACCAGG	CCGCCTGCGC	ACAGCCTGGG	38040
GCAACTGTGT	CTTCTCCACC	GCCCCCGCCC	CCACCTCCAA	GTTCCTCCCT	CCCTTGTTCG	38100
CTAGGAAATC	GCCACTTTGA	CGACC GGTC	TGATTGACCT	TTGATCAGGC	AAAAACGAAC	38160
AAACAGATAA	ATAAATAAAA	TAACACAAAA	GTAACATACT	AAATAAAATA	AGTCAATACA	38220
ATACAATAAG	ATACAATAAG	ATACGATACG	ATAGGATGCG	ATAGGATACG	ATAGGATACA	38280
ATACAATAGG	ATACGATACA	ATACAATACA	ATACAATACA	ATACAATACA	ATACAATACA	38340
ATACAATACA	ATACAATACG	CCGGGCGCGG	TGGCTCATGC	CTGTCATCCC	GTCAGTTTGG	38400
GATGCCGAGG	TGGACGCATC	ACCTGAAGTC	GGGAGTTGGA	GACAAGCCCG	ACCAACATGG	38460
AGAAATCCCG	TCTCAATTGA	AAATACAAAA	CTAGCCGGGC	GCGGTGGCAC	ATGCCTATAA	38520
TCCCAGCTGC	TAGGAAGGCT	GAGGCAGGAG	AATCGCTTGA	ACCTGGGAAG	CGGAGGTTGC	38580
AGTGAGCCGA	GATTGCGCCA	TCGCACTCCA	GTCTGAGCAA	CAAGAGCGAA	ACTCCGTCTC	38640
AAAAATAAAT	ACATAAATAA	ATACATACAT	ACATACATAC	ATACATACAT	ACATACATAC	38700
ATAAATTAAT	ATAAATAAAT	AAAAATAAAT	AAATAAATGG	GCCCTGCGCG	GTGGCTCAAG	38760
CCTGTCATCC	CCTCACTTTG	GGAGGCCAAG	GCCGGTGGAT	CAAGAGGCGG	TCAGACCAAC	38820
AGGGCCAGTA	TGGTGAACCC	CGGTCTCTAC	TCACAATACA	CAACATTAGC	CGGGCGCTGT	38880
GCTGTGCTGT	ACTGTCTGTA	ATCCCAGCTA	CTCGGGAGGC	CGAGCTGAGG	CAGGAGAATC	38940
GCTTGAACCT	GGGAGGCGGA	GGTTGCACTG	AGCCGAGATC	GCGCCACTGC	AACCCAGCCT	39000
GGGCGACAGA	GCGGAGACTCC	GTCTCCAAAA	AATGAAAAATG	AAAAAGAAAC	GCAACAAAAAT	39060
AATTAATAAG	TGAGTTTCTG	GGGAAAAAGA	AGAAAAAGAAA	AAAGAAAAAA	ACAACAAAAAC	39120
AGAACAACCC	CACCGTGACA	TACACGTACG	CTTCTCGCCT	TTCCGAGGCT	CAAAACAGTT	39180
AGGAATTATG	CGTGATTTCT	TTTTTTAACT	TCATTTTATG	TTATTTATCAT	GATTGATGTT	39240
TCGAGACGGA	GTCTCGGAGG	CCCGCCCTCC	CTGGTTGCCC	AGACAACCCC	GGGAGACAGA	39300
CCCTGGCTGG	CCCCGATTTG	TCTTCTCCTT	GCTCAGGGGT	TTCTTCTGCT	TTCTTCTGCT	39360
CTTTAAACCG	CGTGGACTCT	TCCGCCCTCG	GTTTGACAGA	TGGCAGCTCC	ACTTTAGGCC	39420
TTGTTGTGTT	TGGGGACTTT	CCTGATTCTC	CCCAGATGTA	GTGAAAGCAG	GTAGATTGCC	39480
TTGCCTGGCC	TTGCCCTGGCC	TTGCCCTTTT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTA	TTACTTTCTC	39540
TTTTTCTTCT	TCTTCTTCTT	CTTTTTTTTG	AGACAGAGTT	TCACCTTTGT	TGCCCCAGGCT	39600
AGAGGGCAAT	GGCGCGATCT	CGGCTCACCG	CACCCTCCGC	CTCCAGGTTT	CAAGCGATTG	39660
TCCTGCCTCA	GCCTCCTGAT	TAGCTGGGAT	TACAGGCATG	GGCCACCGTG	CTGGCTGATG	39720
TTTGTAATTT	TAGTAGAGAC	GGTGTTTTTT	CATGTTGGTC	AGGCTGGTCT	CCCACTCCCCA	39780
ACCTCAGGTG	GTCCGCCCTG	CTTAGCCTCC	CAAAGTGCTG	GGATGACAGG	CGTGCAACCG	39840
CGCCAGCCTT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCGCTCGCT	TGCTTGCTTG	CTTTCGTGCT	39900
TTCTTGCTTT	CCCGTTTTCT	TGCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTTCTTTCTT	GCTTGCTTTT	39960
TTGCTTGCTT	GCTTGCTTTT	GTGCTTTCTT	GCTTTCTGCT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTT	40020
TTTCTTTCTT	TGTTTTCTTT	CTTGCTTGCT	TTCTTGCTTG	CTTGCTTGCT	TTCTTGCTTT	40080
CTTGCTTTCC	TGTTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	TCTTTCTTGC	TTGCTTTCTT	40140
GCTTGCTTGC	TTTCGTGCTT	TCTTGTTTTT	TCGATTCTTT	TCTTTCTTTT	GTTCCTTTCC	40200
TGCTTGCTTT	CTTGCTTGCT	TGCTTTCTGT	CTTCTTGCTT	TCCGTTTTTC	TTTCTTTCTT	40260
TCCTTGCTTT	GTTCCTTTCT	TGCTTGCTTT	CTTGCTTGCT	TGCTTTCTGT	CTGCTTGTGT	40320
TCTCGATTTC	TTTCTTTCTT	TTGTTTTCTT	CCTGCTTGCT	TTCTTGCTTG	ATTGCTTTCT	40380
TGCTTTCTTG	CTTCTTTGTT	TTCTTTCTTT	CTTTTGTTTC	TTTCTTTCTT	GCCTTCTTGT	40440
TTTCTTGCTT	TCTTGCTTGC	TTGCTTTCTG	GCTTTCTTGT	TTTCTTGCTT	TCCTTCTTTT	40500
GTTCCTTTCT	TGCTTGCTTT	CTTGCTTCTT	TGTTTTCTTG	CTTCTTGCTT	TGCTTGCTTT	40560
CGTGCTTTCT	TTCTTGCTTT	CTTTCTTTTC	TTTCTTTCTT	TTTCTTTCTT	TTCTTGCTTT	40620
CTTTCTTTTC	ATCATCATCT	TTCTTTCTTT	CCTTTCTTTT	TTTCTTTCTT	TCTATCTTTT	40680
TTTCTTTCTT	TCCTTTCTTT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTGTT	TCGTCTTTT	GAGACAGAGT	40740
TTCACTCTTG	TTTCCACGGC	TAGAGTGCAA	TGGCGCGATC	TTGGCTCACC	GCACCTTCCG	40800
CCTCCCGGGT	TCGAGCGCTT	CTCCTGCCCT	CAGCCTCCCG	ATTAGCGGGG	ATTGACAGGG	40860
AGGCACCCCC	ACGCCTGGCT	TGGCTGATGT	TTGTGTTTTT	AGTAGGCACG	CCGTGCTCTT	40920
CCATGTTGCT	CAGGCTGGCT	TCCAACTCCC	GACCTCCTGT	GATGCGCCCA	CCTCGGCCTC	40980
TCGAAGTGCT	GGGATGACGG	GCGTGACGAC	CGTGCCCGGC	CTGTTGACTC	ATTTGCGTTT	41040
TTTATTTCTT	TCGTTTCCAC	GCGTTTACTT	ATATGTATTA	ATGTAACCGT	TTCTGTACGC	41100
TTATATGCAA	ACAACGACAA	CGTGTATCTC	TGCATTGAAT	ACTCTTGCGT	ATCGTAAATA	41160
CGTATCGGTT	GTATGGAAT	AGACTTCTGT	ATGATAGATG	TAGGTGTCTG	TGTTATACAA	41220
ATAAATACAC	ATCGCTCTAT	AAAGAAGGGA	TGCTCCGATA	AGACGTTTAT	TTTACGTATG	41280
AAAAGCGTCG	TATTTATGTG	TGTAATGAA	CCGAGCGTAC	GTAAGTTATCT	CTGTTTCTTT	41340
TCTTCTCTCT	CTTCGTGTTT	TTCTTCTTTC	CTTCTTCTCT	TTCTTCTCTT	CTTTAGGTTT	41400
TTCTTCTCTT	CTTCTTCTCT	TTCTTCTCTT	CTTCTGCTCC	TTTTTTCTTT	CGTGCTTTAT	41460
TTCTTCTTCT	TTCCCTGTGT	TTCTTCTTCT	TTTCTTTCTT	CTCTGTTTCT	TTTTCCCTTC	41520

TTTCCTTCGT	TTCTTTCCTC	ATTCTTTCTC	TCTTTTTTCGT	TGTTTCTTTC	CTTCCCGTCT	41580
GTCTTTTAAA	AAATTGGAGT	GTTTCAGAAG	TTTACTTTGT	GTATCTACGT	TTTCTAAATT	41640
GTCTCTCTTT	TCTCCATTTT	CTTCCTCCCT	CCCTCCCTCC	CTCCCTGCTC	CCTTCCCTCC	41700
CTCCTTCCCT	TTCGCCATCT	GTCTCTTTTC	CCCACTCCCC	TCCCCCGGTC	TGTCTCTGCG	41760
TGGATTCCGG	AAGAGCCTAC	CGATTCTGCC	TCTCCGTGTG	TCTGCAGCGA	CCCCGCGACC	41820
GAGTCCTTGT	GTGTTCTTTC	TCCCTCCCTC	CCTCCCTCCC	TCCCTCCCTC	CCTCCCTGCT	41880
TCCGAGAGGC	ATCTCCAGAG	ACCGCGCCGT	GGGTTGTCTT	CTGACTCTGT	CGCGGTGAG	41940
GCAGAGACGC	GTTTTGGGCA	CCGTTTGTGT	GGGGTTGGGG	CAGAGGGGCT	GCGTTTTCGG	42000
CCTCGGGAAG	AGCTTCTCGA	CTCACGGTTT	CGCTTTCGCG	GTCCACGGGC	CGCCCTGCCA	42060
GCCGGATCTG	TCTCGCTGAC	GTCCGCGGCG	GTTGTGCGGC	TCCATCTGGC	GGCCGCTTTG	42120
AGATCGTGCT	CTCGGCTTCC	GGAGCTGCGG	TGGCAGCTGC	CGAGGGAGGG	GACCGTCCCC	42180
GCTGTGAGCT	AGGCAGAGCT	CCGAAAAGCC	CGCGGTCTGT	AGCCCGGCTG	GCCCGGTGGC	42240
GCCAGAGCTG	TGGCCGGTCC	CTTGTGAGTC	ACAGCTCTGG	CGTGCAGGTT	TA'TGTGGGGG	42300
AGAGGCTGTC	GCTGCGCTTC	TGGGCCCCGCG	GCGGGCGTGG	GGCTGCCCGG	GCCGGTCGAC	42360
CAGCGCGCCG	TAGCTTCCCGA	GGCCCCGAGCC	GCGACCCGGC	GGACCCGCGG	CGCGTGGCGG	42420
AGGCTGGGGA	CGCCCTTCCC	GGCCCGGTCC	CGGTCCGCTC	ATCCTGGCCG	TCTGAGGCGG	42480
CGGCCGAATT	CGTTTCCGAG	ATCCCCGTGG	GGAGCCGGGG	ACCGTCCCGC	CCCCGTCCCC	42540
CGGGTGCCCG	GGAGCGGTCC	CCGGGCCGGG	CCGCGGTCCC	TCTGCCCGGA	TCCTTTCTGG	42600
CGAGTCCCCG	TGGCCAGTCG	GAGAGCGCTC	CCTGAGCCGG	TGCGGCCCGA	GAGGTCGCGC	42660
TGGCCGCGCT	TCCGTCCCTC	GTGTGTCCCG	GTCGTAGGAG	GGGCGGCGCG	AAAATGCTTC	42720
CGGCTCCCCG	TCTGGAGACA	CGGCGCGGCC	CCTGCGTGTG	GCCAGGGCGG	CCGGGAGGGC	42780
TCCCCGGCCC	GGCGCTGTCC	CCGCGTGTGT	CCTTGGGTTG	ACCAGAGGGA	CCCCGGGCGC	42840
TCCGTGTGTG	GCTGCGATGG	TGGCGTTTTT	GGGGACAGGT	GTCCGTGTCC	GTGTGCGCGC	42900
TCCCTTGGGC	CGGCGGCGTG	GTCGGTGACG	CGACCTCCCC	GCCCCGGGGG	AGGTATATCT	42960
TTCCGCTCCGA	GTCGGCAATT	TTGGGCCGCC	GGGTTATAT			42999

配列番号：18

配列の長さ：175

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

CTCCGGCGCG GCGCCCGTGT TCGCCGTTCC CGTGGCGCGG ACAATGCGGT TGTGCGCGTCCA 60
 CGTGTGCGTG TCCGTGCACT GCGGTTGTGG AGTGCCCTCGC TCTCCTCCTC CTCCCCGGCA 120
 GCGTTCCAC GGTGGGGAC CACCGGTGAC CTCGCCCTCT TCGGCCCTGG ATCCG 175

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 7 5 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

GGTCTGGTGG	GAATTGTTGA	CCTCGCTCTC	GGGTGCGGCC	TTTGGGGAAC	GGGCGGGTCC	60
GTCGTGCCCC	GCGCCGGACG	TGTGTGCGGG	CCCACTTCCC	GCTCGAGGGT	GGCGGTGGCG	120
GCGGCGTTGG	TAGTCTCCCG	TGTTGCGTCT	TCCCCGGGCTC	TTGGGGGGGG	TGCCGTCTGT	180
TTGGGGGCCC	GCGTTGCTTG	GCTTACGCAG	GCTTGGTTTG	GGACTGCCTC	AGGAGTCGTG	240
GGCGGTGTGA	TTCCCGCCCG	TTTTGCCTCG	CGTCTGCCTG	CTTTGCCTCG	GGTTTGCTTG	300
GTTCGTGTCT	CGGGAGCGGT	GGTTTTTTTT	TTTTTCGGGT	CCCCGGGAGA	GGGGTTTTTC	360
CGGGGGACGT	TCCCGTCGCC	CCCTGCCGCC	GGTGGGTTTT	CGTTTCGGGC	TGTSTTCGTT	420
TCCCCCTTCCC	CGTTTCGCCG	TCGGTTCTCC	CCGGTCGGTC	GGCCCTCTCC	CCGGTCGGTC	480
GCCCCGCCCGT	GCTGCCGGAC	CCCCCTTCT	GGGGGGGATG	CCCGGGCACG	CACGCGTCCG	540
GGCGGCCACT	GTGGTCCGGG	AGCTGCTCGG	CAGGCGGGTG	AGCCAGTTGG	AGGGGCGTCA	600
TGCCCCCGCG	GGCTCCCGTG	GCCGACGCGG	CGTGTTCCTT	GGGGGGGCTT	GTGCGTGCGG	660
GAAGGCTGCG	CACGTTGTCT	GTCCTTGCGA	GGGAAAGAGG	CTTTTTCCTT	TTAGGGGGTC	720
GTCCTTCGTC	GTCCCGTCGG	CGGTGGATCC	GGCCT			755

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 4 6 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

GGCCGAGGTG	CGTCTGCGGG	TTGGGGCTCG	TCCGGCCCCG	TCGTCCTCCG	GGAAGGCGTT	60
TAGCGGGTAC	CGTCGCGCG	CCGAGGTGGG	CGCACGTCCG	TCAGATAACC	CCGAGCGTGT	120
TTCTGGTTGT	TGGCGGCGGG	GGCTCCGGTC	GATGTCTTCC	CCTCCCCCTC	TCCCCGAGGC	180
CAGGTCAGCC	TCCGCCTGTG	GGCTTCGTCT	GCCGTCTCCC	CCCCCCTCAC	GTCCCTCGCG	240
AGCGAGCCCG	TCCGTTTCGAC	CTTCCTTCCG	CCTCCCCCCC	ATCTTTCCGC	GCTCCGTTGG	300
CCCCGGGGTT	TTACAGGCGC	CCCCCAGCCT	CCTCCGCCTC	TCCGCCCGCG	GTTTGGACGC	360
CTGGTTCCGG	ICTCCCCGCC	AAACCCCGGT	TGGGTTGGTC	TCCGGCCCCG	GCTTGCTCTT	420
CGGGTCTCCC	AACCCCGGGC	CGGAAGGGTT	CGGGGGTTCC	GGG		463

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 3 7 8

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセディカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GGATTCTTCA	GGATTGAAAC	CCAAACCGGT	TCAGTTTCCT	TTCCGGCTCC	GGCCGGGGGG	60
GGCGGCCCCG	GGCGGTTTGG	TGAGTTAGAT	AACCTCGGGC	CGATCGCACG	CCCCCGTGG	120
CGGCGACGAC	CCATTGGAAC	GTCTGCCCTA	TCAACTTTCG	ATGGTAGTCG	ATGTGCCTAC	180
CATGGTGACC	ACGGGTGACG	GGGAATCAGG	GTTTCGATTCC	GGAGAGGGAG	CCTGAGAAAC	240
GGCTACCACA	TCCAAGGAAG	GCAGCAGGCG	CGCAAATTAC	CCACTCCCGA	CCCGGGGAGG	300
TAGTGACGAA	AAATAACAAT	ACAGGACTCT	TTCGAGGCC	TGTAATTGGA	ATGAGTCCAC	360
TTTAAATCCT	TTAAGCAG					378

配列番号：22

配列の長さ：378

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

GATCCATTGG	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATTCCAGCTC	CAATAGCGTA	60
TATTAAAGTT	GCTGCAGTTA	AAAAGCTCGT	AGTTGGATCT	TGGGAGCGGG	CGGGCGGTCC	120
GCCGCGAGGC	GAGTCACCGC	CCGTCCCCGC	CCCTTGCCCTC	TCGGCGCCCC	CTCGATGCTC	180
TTAGCTGAGT	TGTCCCGCGG	GGCCCGAAGC	GTTTACTTTG	AAAAAATTAG	AGTTGTTTCA	240
AAGCAGGCCC	GAGCCGCCTG	GATACCGCCA	GCTAGGAAAT	AATGGAATAG	GACCGCGGTT	300
CCTATTTTGT	TTGGTTTTTCG	GAACTGAGCC	CATGATTAAG	GGAAACGGCC	GGGGGCATTG	360
CCTTATTGCG	CCCCCTA					378

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 7 1 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列：

GGATCTTTCC	CGCTCCCCGT	TCCTCCCCGC	CCCTCCACCC	GCGCGTCTCC	CCCCTTCTTT	60
TCCCCTCTCC	GGAGGGGGGG	GAGGTGGGGG	CGCGTGGGCG	GGGTCCGGGG	TGGGTCGGGC	120
GGGGGACCGC	CCCCGGCCGG	CAAAAGGCCG	CCGCCGGGCG	CACTTCAACC	GTAGCGGTGC	180
GCCGCGACCG	GCTACGAGAC	GGCTGGGAAG	GCCCGACGGG	GAATGTGGCT	CGGGGGGGGC	240
GGCGCGTCTC	AGGGCGCGCC	GAACCACTC	ACCCGAGTG	TTACAGCCCT	CCGGCCGCGC	300
TTTCGCGGAA	TCCCGGGGCC	GAGGGGAAGC	CCGATACCCG	TCGCCGCGCT	TTCCCCCTCC	360
CCCCGTCCGC	CTCCCGGGCG	GGCGTGGGGG	TGGGGGCCCG	GCCGCCCTC	CCACGCCCGT	420
GGTTTCTCTC	TCTCCCGGTC	TCGGCCGGTT	TGGGGGGGGG	AGCCCGGTTG	GGGGCGGGGC	480
GGACTGTCCT	CAGTGCGCCC	CGGGCGTCGT	CGCGCCGTCC	GGCCCGGGGG	GTCTCTCGG	540
TCACGCCGCC	CCCCACGAAG	CCGAGCGCAC	GGGGTCGGCG	GCGATGTCGG	CTACCCACCC	600
GACCCGTCTT	GAAACACGGA	CCAAGGAGTC	TAACGCGTGC	GCGAGTCAGG	GGCTCGCACG	660
AAAGCCGCCG	TGGCGCAATG	AAGGTGAAGG	GCCCCGTCCG	GGGGCCCGAG	GTGGGATCC	719

配列番号：24

配列の長さ：685

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

CGAGGCCTCT	CCAGTCCGCC	GAGGGCGCAC	CACCGGCCCG	TCTCGCCCGC	CGCGTCGGGG	60
AGGTGGAGCA	CGAGCGTACG	CGTTAGGACC	CGAAAGATGG	TGAACTATGC	CTGGGCAGGG	120
CGAAGCCAGA	GGAAACTCTG	GTGGAGGTCC	GTAGCGGTCC	TGACGTGCAA	ATCGGTCGTC	180
CGACCTGGGT	ATAGGGGCGA	AAGACTAATC	GAACCATCTA	GTAGCTGGTT	CCCTCCGAAG	240
TTTCCTCTAG	GATAGCTGGC	GCTCTCGCAA	CCTTCGGAAG	CAGTTTATC	CGGGTAAAGG	300
CGGAATGGAT	TAGGAGGTCT	TGGGGCCGGA	AACGATCTCA	AACTATTCT	CAAACCTTAA	360
ATGGGTAAGG	AAGCCC GGCT	CGCTGGCGTG	GAGCCGGGCG	TGGAATGCGA	GTGCCTAGTG	420
GCCCACTTTT	GCTAAGCAGA	ACTGGCGCTG	CGGGATGAAC	CGAACGCCGG	GTTAAGGCGC	480
CCGATGCCGA	CGCTCATCAG	ACCCCAGAAA	AGGTGTTGGT	TGATATAGAC	AGCAGGACGG	540
TGGCCATGGA	AGTCGGAATC	CGCTAAGGAG	TGTGTAACAA	CTCACCTGCC	GAATCAACTA	600
GCCCTGAAAA	TGGATGGCGC	TGGAGCGTCG	GGCCCATACC	CGGCCGTCGC	CGGCAGTCGG	660
AACGGGACGG	GACGGGAGCG	GCCCGC				685

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

GAGGAATTCC CCTATCCCTA ATCCAGATTG GTG

33

配列番号：26

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

AAACTGCAGG CCGAGCCACC TCTCTTCTGT GTTTG

35

配列番号：27

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

AGGAATTCAC AGAAGAGAGG TGGCTCGGCC TGC

33

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 3 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

AGCCTGCAGG AAGTCATACC TGGGGAGGTG GCCC

34

配列番号：29

配列の長さ：80

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

AAACTGCAGG TTAATTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCT AACCTAACC CTAACCCTAA 60

CCCTAACCT AACCCGGGAT 80

配列番号：30

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： G e n o m i c D N A

ハイボセティカル： N o

アンチセンス： N o

フラグメント型：

起源：

配列：

TTGGGCCCTA GGCTTAAGG

19

配列番号： 3 1

配列の長さ： 2 5

配列の型： 核 酸

鎖の数： 一 本 鎖

トポロジー： 直 鎖 状

配列の種類： G e n o m i c D N A

ハイボセティカル： N o

アンチセンス： N o

フラグメント型：

起源：

配列：

GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC GACGT

25

配列番号 : 3 2

配列の長さ : 2 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N o

アンチセンス : N o

フラグメント型 :

起源 :

配列 :

GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAAC

26

配列番号 : 3 3

配列の長さ : 2 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGAT

26

配列番号：34

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GGGTTTAAAC AGATCTCTGC A

21

【図1】

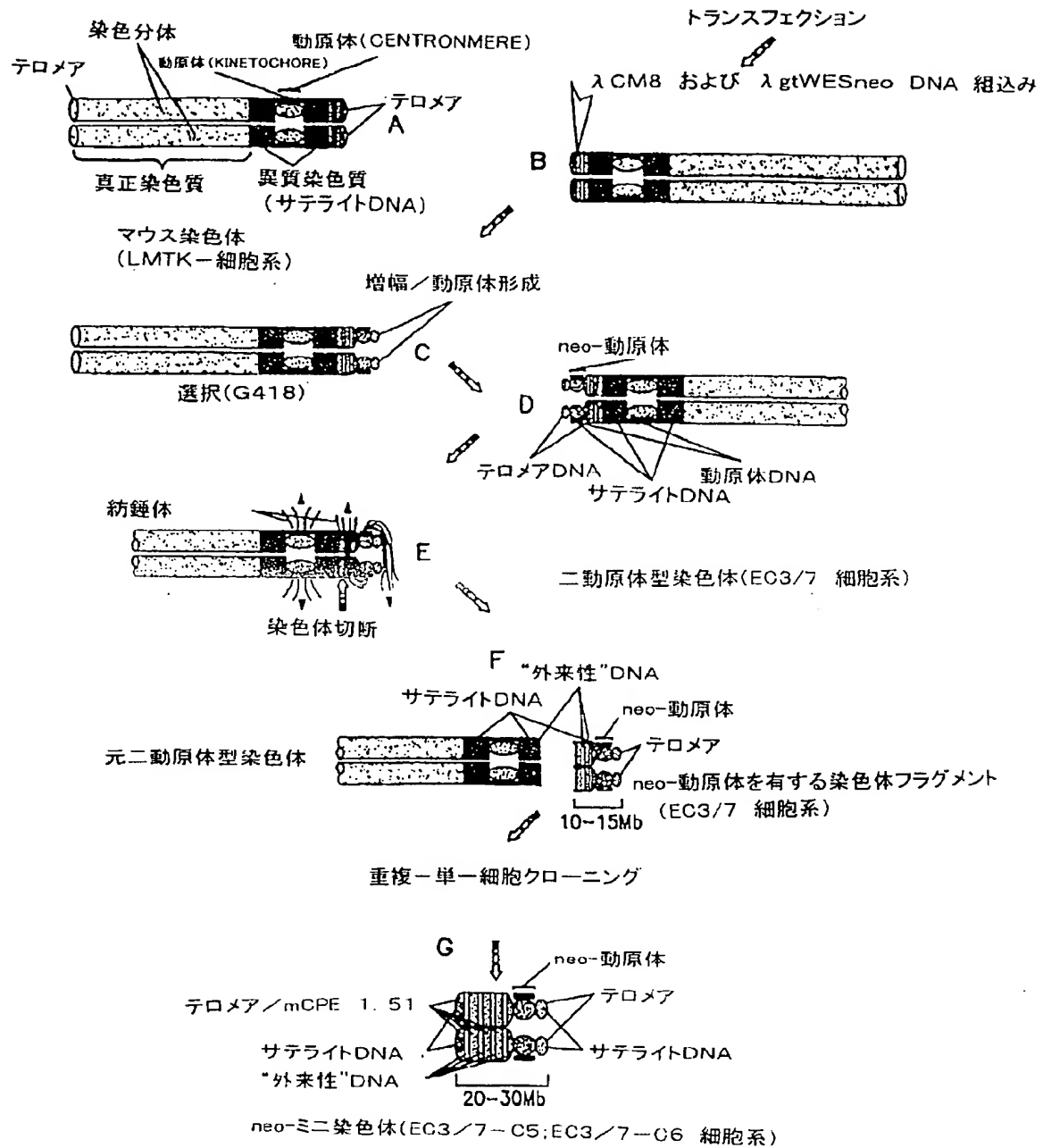


FIG. 1

【図2】

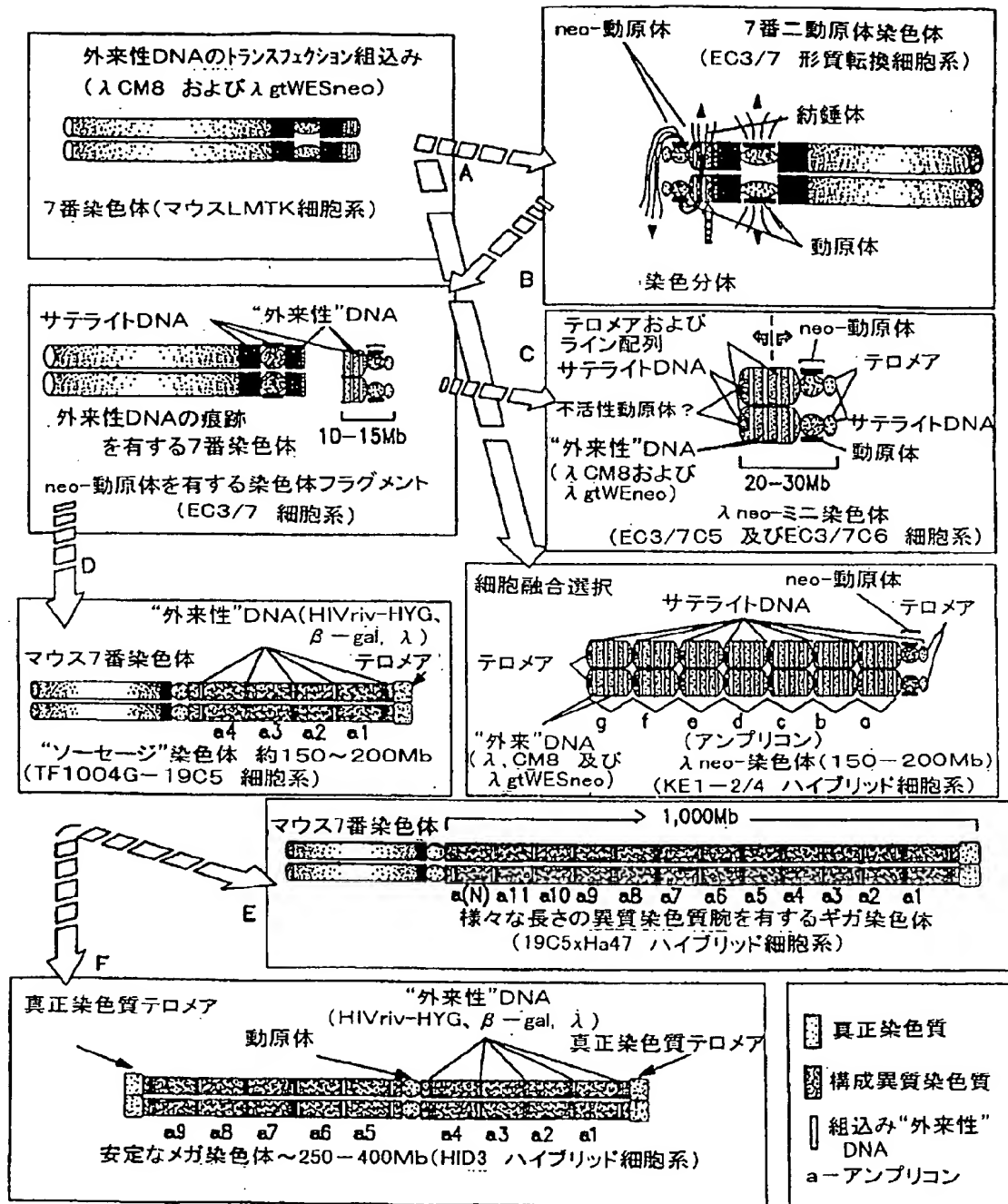


FIG. 2

【図3】

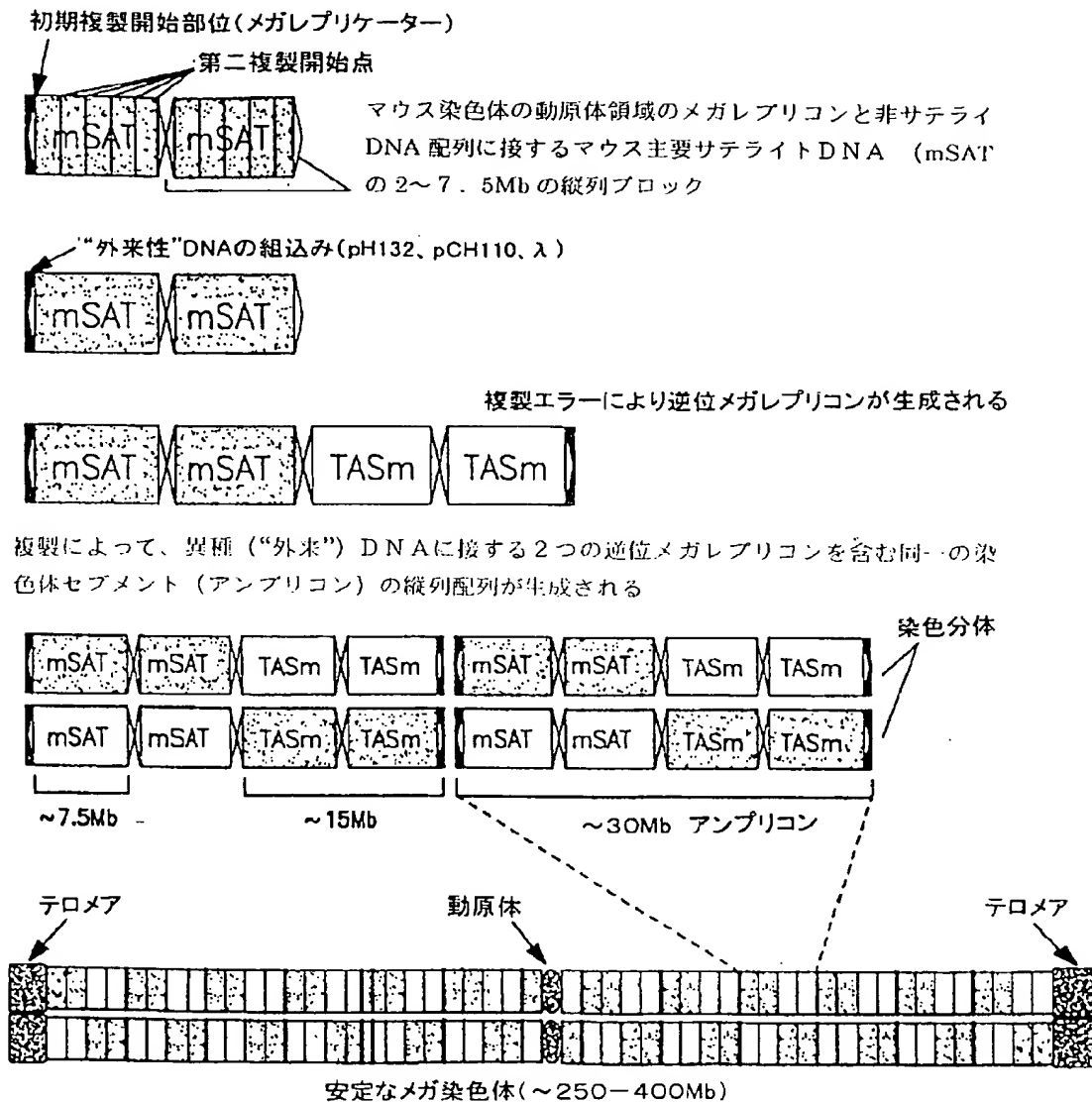


FIG. 3

【図4】

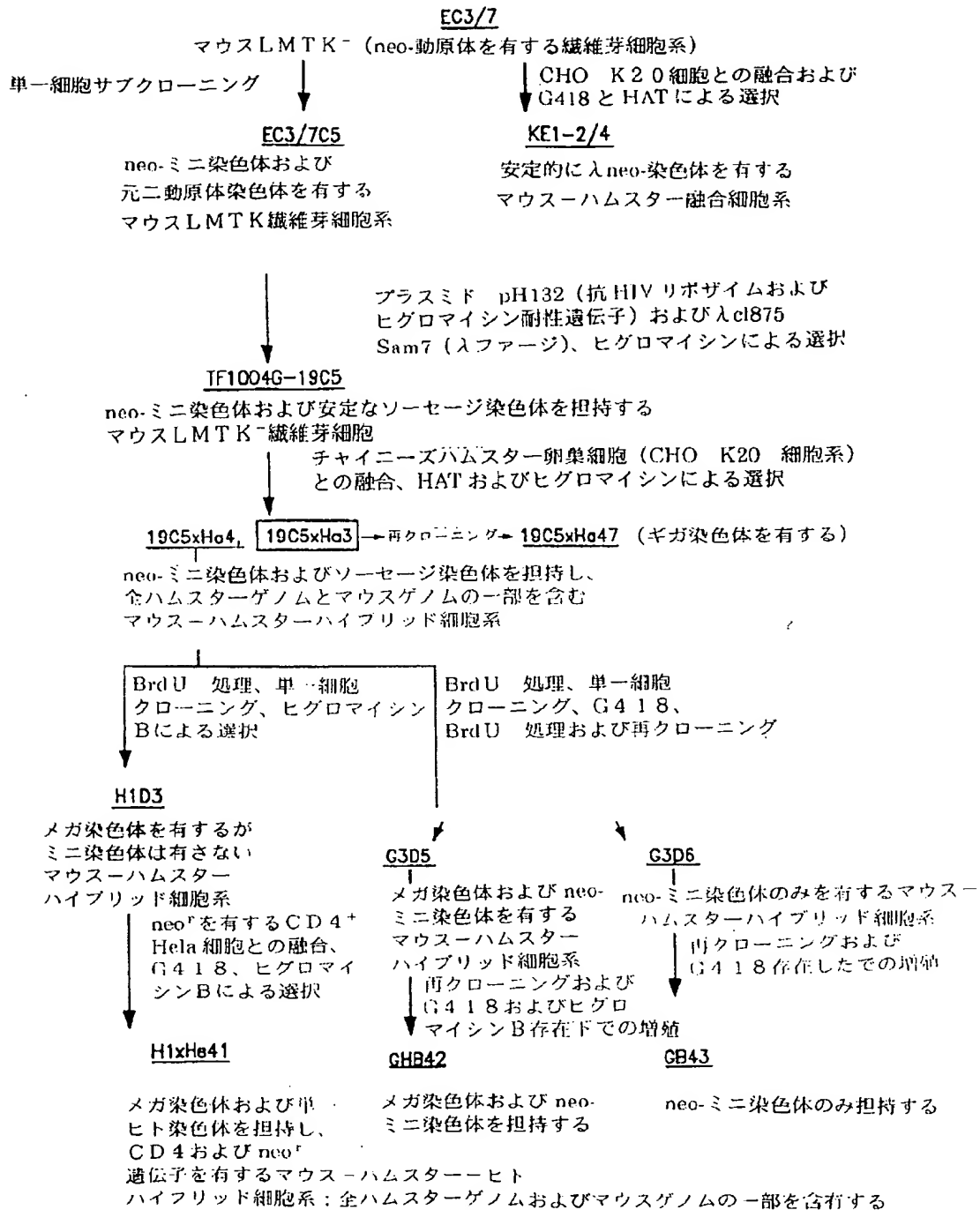


FIG. 4

FIG. 15

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年6月23日(1997. 6. 23)

【補正内容】

請求の範囲

1. 選択可能マーカーを含む1つまたはそれ以上のDNAフラグメントを細胞に導入する段階と、

前記1つまたは複数のDNAフラグメントをゲノムDNAに取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

サテライト人工染色体を含む細胞を選択する段階とから成る人工染色体の製造方法。

2. 1つまたは複数のDNAフラグメントを細胞の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍に導入することを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 増幅可能領域がrDNAから成ることを特徴とする請求項2に記載の方法。

4. 増幅可能領域が異質染色質から成ることを特徴とする請求項2に記載の方法。

5. 細胞の染色体の挟動原体異質染色質にDNAを導入することを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

6. 細胞が哺乳類細胞であることを特徴とする請求項1に記載

の方法。

7. 更に、サテライト人工染色体を単離する段階を含むことを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

8. 1つまたは複数のDNAフラグメントが、当該フラグメントを染色体の異質染色質領域にターゲットするヌクレオチドの配列を含むことを特徴とする請求項1から7のいずれか一項の方法。

9. ターゲティングヌクレオチド配列がサテライトDNAから成ることを特徴とする請求項8に記載の方法。

10. 細胞がヒト細胞であることを特徴とする請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

- 11. 細胞が、魚類、昆虫類、爬虫類、両棲類、蜘蛛類または齧歯類の細胞であることを特徴とする請求項1から5及び7から9のいずれか一項に記載の方法。
- 12. 請求項1から11のいずれか一項に記載の方法によって製造されるサテライト人工染色体。
- 13. 実質的に純粋な単離されたサテライト人工染色体。
- 14. 約50～約450メガ塩基から成るメガ染色体であることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。

- 15. 約250～約400Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
- 16. 約150～約200Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
- 17. 約90～約120Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
- 18. 約15～約60Mbから成ることを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。
- 19. 請求項1から11のいずれか一項に記載の方法によって製造される人工染色体を含む細胞。
- 20. 請求項12から19のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体を含む細胞。
- 21. 哺乳類細胞であることを特徴とする請求項19または20に記載の細胞。
- 22. サテライト人工染色体がメガ染色体であり、方法が更に、
断片化用ベクターを導入し、これによって細胞内のメガ染色体のサイズを小さくする段階と、
約15～約60Mbのサテライト人工染色体を含む細胞を同定する段階とを含むことを特徴とする請求項1から11のい

れか一項に記載の方法。

- 23. サテライト人工染色体がメガ染色体であり、方法が、

欠失形メガ染色体を含む細胞が産生される条件を細胞に作用させる段階を更に含むことを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

24. 前記条件が、X線照射と、染色体内部の塩基対合を不安定化する物質の存在下の増殖とから選択されることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

25. 前記物質がプロモデオキシウリジンであることを特徴とする請求項 24 に記載の方法。

26. 更に、約 15 ～ 約 60 Mb から成るサテライト人工染色体を含んでいる細胞を選択する段階を含むことを特徴とする請求項 22 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

27. 請求項 22 から 25 のいずれか一項に記載の方法によって製造された人工染色体を含む細胞。

28. 人工染色体が約 10 ～ 約 60 Mb から成るサテライト人工染色体であることを特徴とする請求項 19 から 21 及び 25 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

29. 約 10 ～ 約 60 Mb から成ることを特徴とする請求項 1

3 に記載の実質的に純粋な単離されたサテライト人工染色体。

30. 細胞からサテライト人工染色体を単離する段階を更に含むことを特徴とする請求項 1 から 11 及び 22 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

31. 単離が、

中期染色体を単離し、

内因性染色体からサテライト人工染色体を識別し、

内因性染色体からサテライト人工染色体を分離することによって行われることを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

32. DNA配列特異的染料で染色体を染色することによってサテライト人工染色体を内因性染色体から識別し、フローセルソーターによって分離することを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

33. 選択可能マーカーを含む 1 つまたは複数の DNA フラグメントを細胞に導入する段階と、

前記 1 つまたは複数の DNA フラグメントをそのゲノム DNA に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、
増殖した細胞から新規な動原体を含む二動原体型染色体を有

する細胞を選択する段階と、

サテライト人工染色体が産生される条件下で細胞を増殖させる段階とから成る人工染色体の製造方法。

34. 選択可能マーカーを含む 1 つまたは複数の DNA フラグメントを細胞に導入する段階と、

前記 1 つまたは複数の DNA フラグメントをそのゲノム DNA に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

増殖した細胞から新規な動原体を含む二動原体型染色体を有する細胞を選択する段階と、

サテライト人工染色体が産生される条件下で細胞を増殖させる段階と、

二動原体型染色体が分裂して元二動原体型染色体を産生する細胞を産生させるために細胞を増殖させる段階と、

元二動原体型染色体を有する細胞を選択する段階と、

ソーセージ型染色体が産生される条件下で細胞を増殖させる段階とから成る人工染色体の製造方法。

35. 1 つまたは複数の DNA フラグメントを細胞内の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍に導入することを特徴と

する請求項 33 または 34 に記載の方法。

36. 増幅可能領域が rDNA から成ることを特徴とする請求項 35 に記載の方法。

37. 増幅可能領域が異質染色質から成ることを特徴とする請求項 35 に記載の方法。

38. DNA を細胞の染色体の挟動原体異質染色質に導入することを特徴とする請求項 34 または 35 に記載の方法。

39. 更に、

サテライト人工染色体にターゲットされる断片化用ベクターを導入する段階と、細胞を増殖させる段階と、断片化用ベクターが導入された細胞のサテライト人工染色体よりも小さいサテライト人工染色体を含む細胞を選択する段階とから成ることを特徴とする請求項33に記載の方法。

40. 選択可能マーカーを含むDNAフラグメントを細胞に導入する段階と、

前記DNAフラグメントをそのゲノムDNAに取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

増殖した細胞から二動原体型染色体を産生した細胞を選択する段階と、

異質染色質アームをもつ染色体を含んでいる細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階とから成る人工染色体の製造方法。

41. 更に、異質染色質アームをもつ染色体を含んでいる細胞を選択する段階と、染色体を不安定化する物質の存在下で前記細胞を増殖させる段階とを含むことを特徴とする請求項40に記載の方法。

42. 更に、約50～約400Mbの異質染色質性の染色体を有している細胞を同定する段階を含むことを特徴とする請求項41に記載の方法。

43. 細胞内の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍にDNAフラグメントを導入することを特徴とする請求項40から42のいずれか一項に記載の方法。

44. 増幅可能領域がrDNAから成ることを特徴とする請求項43に記載の方法。

45. 増幅可能領域が異質染色質から成ることを特徴とする請求項43に記載の方法。

46. DNAを細胞の染色体の挟動原体異質染色質に導入することを特徴とする請求項43に記載の方法。

47. サテライト人工染色体を胚細胞に導入する段階から成る（ヒト以外の）トランスジェニック動物の産生方法。

- 48. 胚細胞が幹細胞であることを特徴とする請求項47に記載の方法。
- 49. 胚細胞が胚に存在することを特徴とする請求項47に記載の方法。
- 50. サテライト人工染色体が遺伝子産物をコードするヘテロログスDNAであることを特徴とする請求項47から49のいずれか一項に記載の方法。
- 51. サテライト人工染色体が治療物質をコードするヘテロログスDNAを含むことを特徴とする請求項47から50のいずれか一項に記載の方法。
- 52. 抗HIVリボザイムが抗gagリボザイムであり、腫瘍抑制遺伝子がp53であることを特徴とする請求項51に記載の方法。
- 53. 産生物が、発現によって（ヒト以外の）トランスジェニック動物中の病原体に対する免疫防御応答を誘発する抗原を含むことを特徴とする請求項50に記載の方法。
- 54. 産生物が、発現によって複数の病原体に対する免疫防御

応答を誘発する複数の抗原を含むことを特徴とする請求項50に記載の方法。

- 55. （ヒト以外の）トランスジェニック動物が魚類、昆虫類、爬虫類、両棲類、蜘蛛類または哺乳類であることを特徴とする請求項47から54のいずれか一項に記載の方法。
- 56. サテライト人工染色体が、細胞融合、キャリア系による脂質仲介トランスフェクション、マイクロインジェクション、マイクロセル融合、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクティル、核移入、衝撃または直接DNA移入によって導入されることを特徴とする請求項47から55のいずれか一項に記載の方法。
- 57. 請求項47から56のいずれか一項に記載の方法によって産生される（ヒト以外の）トランスジェニック動物。
- 58. 魚類、昆虫類、爬虫類、両棲類、蜘蛛類または哺乳類であることを特徴とする請求項57に記載のトランスジェニック動物。
- 59. 選択可能マーカーを含むDNAフラグメントを細胞に導入する段階と、
前記DNAフラグメントをそのゲノムDNAに取込んだ細胞

が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、
新規な動原体と選択可能マーカーと真正染色質とを含む約10Mb～約50Mbのミニ染色体を含む細胞を選択する段階と、
ミニ染色体を単離する段階と、
ミニ染色体を植物または動物の細胞に導入する段階と、
トランスジェニック動物または植物が発生する条件下で動物または植物の細胞を培養する段階とから成るトランスジェニック植物または動物の産生方法。
60. 細胞の選択後に、1つまたは複数の遺伝子産物をコードするDNAを細胞に導入し、(1つまたは複数の)遺伝子産物をコードするDNAを含むミニ染色体を有している細胞が産生される選択条件下で細胞を増殖させることを特徴とする請求項59に記載の方法。
61. 動物または植物の動原体のクローニング方法であって、
植物または動物のゲノムを含むDNAフラグメントのライブラリーを調製する段階と、
選択された植物または動物の異なる種に由来の動原体と選択可能マーカーとを各々を含む哺乳類サテライト人工染色体に前記フラグメントの各々を導入する段階と、

前記サテライト人工染色体の各々を細胞内に導入して選択条件下で細胞を増殖させる段階と、
サテライト人工染色体を有している細胞を同定する段階と、
これらの細胞から出発サテライト人工染色体の動原体とは異なる動原体を含むサテライト人工染色体を有している細胞を選択する段階とから成る方法。
62. それぞれ受託番号96040926、96040927、96040929及び96040928でECCに寄託されたTF1004G19C5、19C5xHa4、H1D3及びG3D5のいずれかの同定形質を有する細胞系。
63. 約50～400Mbから成るメガ染色体を含む細胞系。
64. メガ染色体が250～約400Mbから成ることを特徴とする請求項63に記載の細胞系。

65. メガ染色体が約150～約200Mbから成ることを特徴とする請求項63に記載の細胞系。

66. メガ染色体が約90～約120Mbから成ることを特徴とする請求項63に記載の細胞系。

67. メガ染色体が約60～約100Mbから成ることを特徴とする請求項63に記載の細胞系。

68. 治療用物質のDNAを含むサテライト人工染色体をターゲット細胞に導入する段階と、

得られたターゲット細胞を宿主動物に導入する段階とから成る遺伝子治療方法

69. ターゲット細胞が、リンパ球、幹細胞、神経細胞、昆虫細胞、ニワトリ細胞または筋肉細胞であることを特徴とする請求項68に記載の方法。

70. ミニ染色体がEC3/7C5細胞系に存在するミニ染色体であることを特徴とする請求項59に記載の方法。

71. 染色体がKE12/4細胞系に存在するλneo染色体であることを特徴とする請求項59に記載の方法。

72. 動物が哺乳動物または卵生動物であり、サテライト人工染色体がタンパク質と、動物の母乳または動物の卵の内部で遺伝子を発現させる調節要素を含むことを特徴とする請求項47に記載の方法。

73. 動物が、雌ウシ、ヤギ、雄ウシ、ブタ及びヒツジから選択されることを特徴とする請求項72に記載の方法。

74. 動物が家禽から選択されることを特徴とする請求項72に記載の方法。

75. サテライト人工染色体がヒト細胞表面タンパク質発現用遺伝子をコードするDNAを含み、それにより動物の器官がヒトタンパク質を発現し、ヒトに移植されたときに拒絶が生じないことを特徴とする請求項47に記載の方法。

76. 配列13、14または15で示される配列を有するDNAから成る単離DNA。

77. 配列13、14または15で示される配列を有するDNAから成る単離DNA。

78. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有する単離DNAフラグメント。

79. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項14に記載のサテライト人工染色体。

80. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。

81. 配列18から24のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項13に記載のサテライト人工染色体。

82. ヘテロログス遺伝子の多数コピーまたは複数のヘテロログス遺伝子から成る人工染色体を含んでいる細胞から成る細胞性産生系。

83. ヘテロログス遺伝子が代謝経路を構成するタンパク質をコードすることを特徴とする請求項82に記載の系。

84. 代謝経路の発現によって産生される物質の発現方法であって、代謝経路を構成するタンパク質が発現されて前記物質を産生する条件下で請求項83に記載の系を培養する段階から成る方法。

85. 産生物がビタミン、ホルモン、ヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質またはペプチドであることを特徴とする請求項84に記載の方法。

86. 動物が卵生であることを特徴とする請求項47に記載の方法。

87. 動物がニワトリであることを特徴とする請求項47に記載の方法。

88. 動物が昆虫であることを特徴とする請求項47に記載の方法。

89. 請求項13から18または79から81のいずれか一項

に記載のサテライト人工染色体を植物細胞に導入する段階と、植物が発生する条件下で細胞を培養する段階とから成るトランスジェニック植物の産生方法。

90. プロトプラスト融合、マイクロインジェクション、マイクロセル融合、脂質仲介遺伝子導入、エレクトロポレーション、微粒子衝撃、または、直接DNA

導入によってサテライト人工染色体を導入することを特徴とする請求項 89 に記載の方法。

91. 請求項 13 から 18 または 79 から 81 のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体を細胞に導入する段階と、(1 つまたは複数の) 遺伝子産物が発現される条件下で細胞を培養する段階とから成る、(1 つまたは複数の) 遺伝子産物の産生方法。

92. 代謝経路を構成するタンパク質をコードする一連の遺伝子の発現によって遺伝子産物が産生されること、及び、サテライト人工染色体がこれらの遺伝子の各々を含むことを特徴とする請求項 91 に記載の方法。

93. 動原体とテロメアとメガレプリケーターと選択可能マーカーとから成り、動原体が請求項 12 から 18 及び 79 から 81 のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体に由来し、真

正染色質 DNA を含む染色体が 50% 未満であることを特徴とする *in vitro* 合成された哺乳類人工染色体。

94. サテライト人工染色体から動原体を単離する段階と、

単離した動原体をテロメアとメガレプリケーターと選択可能マーカーと共に組合せる段階とから成る哺乳類人工染色体 [ISMAC] の *in vitro* 合成方法。

95. 更に、異質染色質を含むことを特徴とする請求項 93 に記載の哺乳類人工染色体。

96. メガレプリケーターが rDNA から成ることを特徴とする請求項 93 または 105 に記載の哺乳類人工染色体。

97. 動原体がヒト動原体であることを特徴とする請求項 93、95 または 96 に記載の哺乳類人工染色体。

98. 動原体がメガ染色体に由来することを特徴とする請求項 93、95、96 または 97 に記載の哺乳類人工染色体。

99. 動原体がヨーロッパ・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャー (ECACC) に受託番号 96040929 で寄託された細胞系の同定形

質の全部を有する細胞系に由来することを特徴とする請求項 93、95、96 または 98 に記載の哺乳類人工染色体。

100. 産生物がホルモン、抗体、サイトカイン、成長因子、調節タンパク質、分泌タンパク質であることを特徴とする請求項 50 に記載の方法。

101. 産生物が嚢胞性線維症トランスメンブラン調節タンパク質 (CFTR)、抗 HIV リボザイムまたは腫瘍抑制遺伝子であることを特徴とする請求項 50 に記載の方法。

102. 動物がヒトであることを特徴とする請求項 61 に記載の方法。

103. 複製可能な哺乳類人工染色体を製造するために、動原体とテロメアとメガレプリケーターと選択可能マーカーとを組合せる段階から成り、動原体が請求項 12 から 18 及び 79 から 81 のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体に由来することを特徴とする *in vitro* 合成された哺乳類人工染色体 (ISMAC) の製造方法。

104. 更に、哺乳類人工染色体中に rDNA を含むことを特徴とする請求項 103 に記載の方法。

105. テロメアが配列 29 の複数の反復を含むことを特徴とする請求項 103 に記載の方法。

106. テロメアが約 1 k B ～ 約 1 M b であり、好ましくは約

1 k B ～ 約 500 k B であることを特徴とする請求項 105 に記載の方法。

107. テロメアが配列 29 の複数の反復を含むことを特徴とする請求項 93 から 98 のいずれか一項に記載の哺乳類人工染色体。

108. テロメアが約 1 k B ～ 約 1 M b であり、好ましくは約 1 k B ～ 約 500 k B であることを特徴とする請求項 107 に記載の哺乳類人工染色体。

109. 選択可能マーカーを含む 1 つまたは複数の DNA フラグメントを細胞に導入する段階と、

前記 1 つまたは複数の DNA フラグメントをそのゲノム DNA に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

異質染色質よりも多い真正染色質を含む人工染色体を有している細胞を選択する段階とから成り、

1 つまたは複数のDNAフラグメントが細胞の染色体の増幅可能領域の内部または近傍に導入されることを特徴とする人工染色体の製造方法。

110. 増幅可能領域がrDNAであることを特徴とする請求

項109に記載の方法。

111. 更に、人工染色体を単離する段階を含むことを特徴とする請求項109または110に記載の方法。

112. 請求項109から111のいずれか一項に記載の方法によって產生される人工染色体。

113. 更に、遺伝子産物をコードするDNAを導入する段階を含み、遺伝子産物をコードするDNAが、選択可能マーカを含むフラグメントに存在するかまたは第二のDNAフラグメントに存在すること、及び、得られたサテライト人工染色体が遺伝子産物をコードするヘテロログスDNAを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

REVISED
VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No.
PCT/US 97/05911A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/90 C12N15/85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPO

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	G. HADLACZY ET AL.: "Centromere formation in mouse cells cotransformed with human DNA and a dominant marker gene" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 88, 1991, WASHINGTON, DC, US, pages 8106-8110, XP002037028 cited in the application see the whole document --- -/-	1-50, 75, 76

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

I later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 1998

Date of mailing of the international search report

10.03.98

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 18 Patentlaan 2
NL - 2200 MV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eps nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat. Application No
 PCT/US 97/05911

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to exam No.
X	EP 0 532 050 A (BIOLOGICAL RESEARCH CENTER OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES) 17 March 1993	33-50, 75,76
Y	see the whole document, specially example 6	1-32
A	& US 5 288 625 A cited in the application	63-65
Y	K. FAYOL ET AL.: "Cloning and molecular characterization of a novel chromosome specific centromere sequence of Chinese hamster" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 18, 1994, OXFORD, GB, pages 3728-3736, XP002037027 cited in the application see the whole document	1-32
X	T. PRAZNOVSZKY ET AL.: "De novo chromosome formation in rodent cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 88, 1991, WASHINGTON, DC, US, pages 11042-11046, XP002037029 see the whole document	33-50, 75,76
X	F. RAYNAL ET AL.: "Complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA gene : comparison with other available homologs" FEBS LETTERS, vol. 167, 1984, AMSTERDAM, NL, pages 263-268, XP002037024 see the whole document, specially figure 2	87-90, 99-101, 103-108, 113
X	R.M. TORCZYNSKI ET AL.: "Cloning and sequencing of a human 18S ribosomal RNA gene" DNA, vol. 4, no. 4, 1985, NEW YORK, NY, US, pages 283-291, XP002037025 see the whole document, specially figure 3	87-90, 99-108, 113
X	S. CROSS ET AL.: "The structure of a subterminal repeated sequence present on many human chromosomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, 1990, OXFORD, GB, pages 6649-6657, XP002037026 see the whole document, specially figure 3	115,117

	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internal Application No
 PCT/US 97/05911

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 23049 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 13 October 1994 see the whole document ---	51-61, 81-84, 96-98, 110,111
A	EP 0 473 253 A (BIOLOGICAL RESEARCH CENTER OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES) 4 March 1992 cited in the application see abstract see examples 1,3 ---	66-72, 112
A	WO 95 32297 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 30 November 1995 see abstract see page 5-6 see example 6 ---	51-65, 73-84, 99,100
A	A. SCHEDL ET AL.: "A method for generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 20, 1993, OXFORD, GB, pages 4783-4787, XP000616418 cited in the application see the whole document ---	51-62
A	WO 94 24300 A (TRANSGENE SA) 27 October 1994 see abstract ---	3,37, 119-122
A	WO 92 17582 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 15 October 1992 see page 11-19 see abstract & US 5 240 840 A cited in the application ---	13-32, 67-72
A	WO 95 29992 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 9 November 1995 see page 12-14 ---	13-32, 67-72
P,X	J. KERESO ET AL.: "De novo chromosome formations by large-scale amplification of the centromeric region of mouse chromosomes" CHROMOSOME RESEARCH, vol. 4, no. 3, 5 June 1996, OXFORD, GB, pages 226-239, XP002037022 see the whole document ---	1-21, 23-50, 75,76, 78, 119-123

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna Application No
PCT/US 97/05911

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>GY. HOLLO ET AL: "Evidence for a megareplicon covering megabases of centromeric chromosome segments" CHROMOSOME RESEARCH, vol. 4, no. 3, 5 June 1996, OXFORD, GB, pages 240-247, XP002037023 see the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-21, 23-32, 35-40</p>

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No
PCT/US 97/05911

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0532050 A	17-03-93	US 5288625 A CA 2078189 A JP 7177881 A	22-02-94 14-03-93 18-07-95
WO 9423049 A	13-10-94	NONE	
EP 0473253 A	04-03-92	CA 2042093 A JP 6121685 A US 5712134 A	10-11-91 06-05-94 27-01-98
WO 9532297 A	30-11-95	AU 2534395 A ZA 9504300 A	10-12-95 24-01-96
WO 9424300 A	27-10-94	FR 2703996 A AU 6571994 A CA 2160697 A EP 0694072 A JP 8508878 T	21-10-94 08-11-94 27-10-94 31-01-96 24-09-96
WO 9217582 A	15-10-92	US 5240840 A	31-08-93
WO 9529992 A	09-11-95	US 5635376 A	03-06-97

Form PCT/US/4/210 (patent family annex) (July 1997)

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 695, 191

(32)優先日 平成8年8月7日(1996. 8. 7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU

(71)出願人 クロモス・モレキュラー・システムズ・インコーポレーテッド

カナダ国、ビー・シー・ブイ・6・テイ
ー・1・ゼット・4、バンクーバー、ノー
ース・ウエスト・マリノ・ドライブ・6660

(72)発明者 ハドラツキー、ジユラ

ハンガリー国、ハー—6723・セグド、ポス
テュエニ・ウ・6

(72)発明者 サーレイ、アラダー・エイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・92346、
ハイランド、フェアウッド・7327